

Identifizierung aktiver mikrobieller Populationen mit Hilfe stabiler Isotope

Dissertation

zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Ingeborg Klara Schwarz
aus Mannheim-Neckarau

Marburg/Lahn 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2003 bis Dezember 2005 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Thauer

Tag der Disputation:

Teile der in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse werden in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Schwarz, J. I. K., Eckert, W. und Conrad, R. 2006. Community structure of *Archaea* and *Bacteria* in a profundal lake sediment, Lake Kinneret (Israel). Syst. Appl. Microbiol. (angenommen)

Schwarz, J. I. K., Lueders, T., Eckert, W. und Conrad R. 2006. Identification of acetate-utilizing *Bacteria* and *Archaea* in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA. Environ. Microbiol. (angenommen)

Inhalt

Abkürzungen	1
Zusammenfassung.....	2
I. Einleitung	4
1. Mikrobielle Ökologie von Süßwasserseen – Das Profundalsediment des See Genezareth als mikrobieller Lebensraum	4
2. Der anaerobe Abbau von organischem Material im Sediment von Süßwasserseen	7
3. Die mikrobielle Gemeinschaft im Sediment von Süßwasserseen	9
4. Bedeutung stabiler Isotope in der mikrobiellen Ökologie	11
5. Ziele dieser Dissertation	14
II. Material und Methoden	15
1. Chemikalien und Gase.....	15
2. Sterilisationsverfahren	15
3. Mikroorganismen.....	16
3.1 Prokaryoten	16
3.1.1 Süßwasser-Medium für die Anzucht von Referenzorganismen	16
3.2 Eukaryoten (<i>Peridinium gatunense</i>)	19
4. Chemische und physikalische Methoden.....	20
4.1 Bestimmung des pH-Wertes	20
4.2 Analyse organischer Säuren (HPLC)	20
4.3 Analyse anorganischer Ionen (Ionenchromatographie)	21
4.4 Gaschromatographische Analysen	22
4.4.1 Messung von Methan und Kohlendioxid.....	22
4.4.2 Messung von Wasserstoff.....	23
4.5 Messung radioaktiver Isotope	23
4.5.1 Szintillationsmessung	23
4.5.2 Analyse von $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ (RAGA)	23
4.6 Messung stabiler Isotope	24

4.6.1	Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid	24
4.6.2	Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Fettsäuren	25
4.7	Berechnungen	26
4.7.1	Methan- und Kohlendioxidkonzentration in Sedimentaufschlämmungen	26
4.7.2	Ratenberechnung der Methan- und Kohlendioxidproduktion in Sedimentaufschlämmungen	26
4.7.3	Partialdruck von Wasserstoff in Sedimentaufschlämmungen	27
4.7.4	Berechnung des respiratorischen Index für die Umsetzung von $[2-^{14}\text{C}]$ - Acetat	27
4.7.5	Berechnung der gebildeten $^{13}\text{CH}_4$ - und $^{13}\text{CO}_2$ -Mengen für die Umsetzung von $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat	27
5.	Molekularbiologische Methoden	28
5.1	Extraktion von Nukleinsäuren aus Sedimentproben und Kulturen	28
5.1.1	Lösungen und Puffer zur Extraktion von Nukleinsäuren	28
5.1.2	Extraktion von Nukleinsäuren	29
5.2	DNase Verdau	30
5.3	Agarosegelelektrophorese	31
5.3.1	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	31
5.3.2	Analyse von Nukleinsäure mittels Agarosegelelektrophorese	31
5.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	31
5.4.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Biophotometer	31
5.4.2	Quantifizierung von RNA mittels RiboGreen	32
5.5	Selektive Isolierung von Nukleinsäuren mittels Stable-Isotope-Probing	33
5.5.1	Lösungen und Puffer für die Herstellung von CsTFA-Gradienten	33
5.5.2	Herstellung von CsTFA-Gradienten	33
5.5.3	Gradientenfractionierung	34
5.5.4	Bestimmung der Gradientendichte mittels Brechungsindex	34
5.5.5	Fällung von RNA aus Gradientenfractionen	34
5.6	PCR-Amplifikation	35
5.6.1	PCR-Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene aus Umweltproben und Klonierungsvektoren	36
5.6.2	RT-PCR bakterieller und archaeeller 16S rRNA aus Umweltproben	38

5.6.3 Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene mittels „real-time“-PCR	39
5.6.4 Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA mittels „real-time“-RT-PCR	42
5.7 Terminale Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse	45
5.7.1 Restriktion amplifizierter Genfragmente	45
5.7.2 Identifizierung von Pseudo-T-RFs („Mung bean“-Nuklease)	46
5.7.3 Analyse verdauter PCR-Amplifikate	47
5.8 Phylogenetische Analysen	48
5.8.1 Herstellung von Klonbibliotheken	48
5.8.2 Lösungen und Puffer für die Sequenzanalyse	49
5.8.3 Sequenzanalyse der Klone	49
5.8.4 Phylogenetische Analyse der Klonsequenzen	51
5.9 Berechnungen ökologischer Indizes	53
5.9.1 Abschätzung des Artenreichtums und der Diversität im Profundalsediment	53
5.9.2 Diversität und Ähnlichkeit von mikrobiellen Gemeinschaften	54
6. Probenahme und Lagerung der Sedimentproben	55
6.1 Probenahme des Profundalsediments	55
6.2 Lagerung und Bearbeitung der Sedimentproben	55
7. Inkubationsexperimente	56
7.1 Herstellung von Sedimentaufschlämmungen	56
7.1.1 Einfluss der Temperatur auf die Methanproduktion	56
7.1.2 Einfluss von Acetat auf die Methanproduktion	57
7.1.3 Respiratorischer Index (RI) für die Umsetzung von [2- ¹⁴ C]-Acetat	57
7.1.4 Identifizierung der acetatverwertenden mikrobiellen Populationen im Profundalsediment des See Genezareth	58
7.1.5 Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse in das Profundalsediment des See Genezareth	59
7.1.6 Einfluss von Algenbiomasse auf die Methanproduktion in verschiedenen Sedimenttiefen	60
7.1.7 Übersicht der Inkubationsexperimente	61

III. Ergebnisse	62
1. Die mikrobielle Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth	62
1.1 Abundanz archaeeller und bakterieller 16S rRNA-Gen-Kopien.....	62
1.2 Struktur und phylogenetische Diversität der archaeellen Gemeinschaft	63
1.3 Struktur und phylogenetische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft.....	67
2. Biogeochemie des Profundalsediments des See Genezareth	73
2.1 Sedimentparameter.....	73
2.2 Methanogenese im Profundalsediment des See Genezareth	73
2.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Methanproduktion.....	74
2.2.2 Einfluss von Acetat auf die Methanproduktion	76
2.2.3 Respiratorischer Index (RI) für die Umsetzung von [2- ¹⁴ C]-Acetat	78
2.2.4 Einfluss von Algenbiomasse auf die Methanproduktion in verschiedenen Sedimenttiefen	79
3. Identifizierung der acetatverwertenden mikrobiellen Populationen im Profundalsediment des See Genezareth.....	80
3.1 Biogeochemische Prozesse nach Zugabe von Acetat	80
3.1.1 Anorganische Ionen und organische Säuren.....	81
3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentration	81
3.1.3 Zeitlicher Verlauf der ¹³ C/ ¹² C-Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid (Umsatz von [2- ¹³ C]-Acetat zu ¹³ CH ₄ und ¹³ CO ₂)	83
3.2 Aktiv acetatverwertende mikrobielle Populationen – RNA-SIP.....	84
3.2.1 Verteilung der Nukleinsäure im Gradienten.....	84
3.2.2 Struktur der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten mikrobiellen Populationen.....	85
3.2.3 Phylogenetische Analyse der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten mikrobiellen Populationen.....	91
4. Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse in das Profundalsediment des See Genezareth.....	96
4.1 Biogeochemische Prozesse nach Zugabe von Algenbiomasse	97
4.1.1 Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes und organischer Säuren.....	97
4.1.2 Zeitlicher Verlauf der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentration	98

4.1.3 Zeitlicher Verlauf der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Fettsäuren, Methan und Kohlendioxid	101
4.2 Aktiv am Abbau von Algenbiomasse beteiligte mikrobielle Populationen	102
4.2.1 Zeitliche Veränderungen in der Struktur der aktiven mikrobiellen Populationen	102
4.2.2 Phylogenetische Analyse der am Abbau von Algenbiomasse beteiligten mikrobiellen Populationen.....	105
4.2.3 Aktive mikrobielle Populationen nach sechstägiger Inkubation – RNA-SIP.....	108
IV. Diskussion	115
1. Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth.....	115
2. Methanogenese im Profundalsediment des See Genezareth	123
3. Identifizierung der aktiv acetatverwertenden mikrobiellen Populationen im Profundalsediment des See Genezareth.....	126
4. Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse in das Profundalsediment des See Genezareth.....	133
5. Abschlussbetrachtung und Ausblick.....	142
V. Literatur.....	145
Anhang A.....	164
A.1 Sequenzdaten zu III.1.2	164
A.2 Sequenzdaten zu III.1.3	165
A.3 Sequenzdaten zu III.3.2	168
A.4 Sequenzdaten zu III.4.2	174
Anhang B.....	182
B.1 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.1.2.....	182
B.2 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.1.3.....	183
B.3 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.3.2.2.....	184

B.4 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.4.2.1	188
B.5 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.4.2.3	189
Lebenslauf.....	191
Danksagung	194

Abkürzungen

CsTFA	Cäsiumtrifluoroacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dpm	Zerfälle pro Minute („decays per minute“)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FG	Feuchtgewicht
FID	Flammenionisationsdetektor
IC	Ionenchromatograph
IRMS	Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometer („isotope ratio mass spectrometer“)
ppm _v	Mischungsverhältnis („parts per million by volume“)
RAGA	Radioaktivitätsgasdetektor
RGD	Reduktivgasdetektor
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RNA-SIP	16S rRNA-basiertes „Stable-Isotope-Probing“
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
sp.	Art („Species“)
spp.	Arten
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
TG	Trockengewicht
T-RF	terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-Galactopyranosid
[U- ¹³ C]-Acetat	vollständig ¹³ C-markiertes Acetat; [1,2- ¹³ C]-Acetat

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Guideline for authors“ des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

Zusammenfassung

Prokaryoten spielen eine entscheidende Rolle am anaeroben Abbau und der Remineralisierung von sedimentiertem organischem Material in den anoxischen Sedimentschichten des Profundals von Süßwasserseen. Am Beispiel des Profundalsediments des See Genezareth wurde hier erstmalig durch die Kombination biogeochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie den Einsatz ^{13}C -markierter Substrate untersucht, welche Mikroorganismen am anaeroben Abbau von Algenbiomasse und Acetat beteiligt sind.

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft im Profundalsediment (0-10 cm Tiefe) zu drei verschiedenen Probenahmezeitpunkten. Hierbei war die mikrobielle Gemeinschaft bezüglich ihrer Abundanz und Zusammensetzung sehr stabil. Die Abundanz der *Bacteria* und *Archaea* im Sediment wurde mittels quantitativer „real-time“-PCR anhand der Anzahl von 16S rRNA-Gen-Kopien bestimmt. Die gesamte prokaryotische Gemeinschaft wurde in hohem Maße von *Bacteria* dominiert (Anteil von ungefähr 99 %). Die Zusammensetzung der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft wurde durch die molekulare Fingerabdruckmethode terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP) kombiniert mit vergleichender Sequenzanalyse untersucht. Die bakterielle Gemeinschaft wies eine hohe phylogenetische Diversität auf, die viele bislang unkultivierte Arten umfasste. Sie wurde von Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* (*Syntrophobacterales* und *Desulfobacterales*) und des *Bacteroidetes*-Phylums dominiert. Im Gegensatz zu den *Bacteria* waren die *Archaea* phylogenetisch weniger divers und wurden von hydrogenotrophen *Methanomicrobiales* und acetoklastischen *Methanosaeta* spp. dominiert.

Bisher war nicht bekannt, wie die mikrobielle Gemeinschaft im Sediment eines Süßwassersees auf sedimentierendes organisches Material reagiert. Im See Genezareth erfolgt der größte Eintrag von organischem Material nach der alljährlichen Blüte der Alge *Peridinium gatunense*. Dieses Sedimentationsereignis wurde durch die Zugabe von *P. gatunense*-Zellen (nicht-markiert und ^{13}C -markiert) zu anaerob inkubierten Sedimentaufschlämmungen simuliert. Während des anaeroben Abbaus der Algenbiomasse entstanden als zentrale Zwischenprodukte Acetat, Propionat und Wasserstoff. Der unmittelbare Anstieg der Acetat-, Propionat-, Wasserstoff-, Kohlendioxid- und Methankonzentrationen mit dem Start der Inkubation ließ eine schnelle Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag der Algenbiomasse erkennen. Diese Reaktion korrelierte mit zeitlichen Veränderungen in der Zusammensetzung ribosomaler RNA

(16S rRNA) der aktiven bakteriellen und archaeellen Populationen. Nach eintägiger Inkubation wurden die aktiven *Bacteria* von den *Deltaproteobacteria* (*Syntrophobacterales*, *Myxococcales* und insbesondere *Desulfobacterales*) dominiert. Des Weiteren wurden Organismen aus dem Cluster I der *Clostridia* gefunden, das sowohl hydrolytische (saccharolytische und proteolytische) als auch fermentierende Bakterien umfasst. Nach sechs Tagen Inkubation wurden die aktiven bakteriellen Populationen durch ein verstärktes Auftreten biopolymerabbauender Mitglieder des *Bacteroidetes*-Phylums charakterisiert. Die Analyse der Sedimentaufschlämmungen mit ^{13}C -markierter Algenbiomasse durch 16S rRNA-basiertes Stable-Isotope-Probing (RNA-SIP) deutete ebenfalls auf eine gesteigerte Aktivität *Bacteroidetes*-verwandter Bakterien zu diesem Zeitpunkt der Inkubation hin. Die Zugabe der ^{13}C -Algenbiomasse führte auch zu einer geringfügigen ^{13}C -Anreicherung archaeeller 16S rRNA. Außerdem ließen die Abnahme der Acetatkonzentration, eine erhöhte Methanproduktionsrate und die Zunahme der relativen Abundanz von *Methanosaeta* spp. auf eine Aktivierung acetoklastischer Methanogener schließen.

Um Einblicke in die Umsetzung von Acetat, dem bedeutendsten Zwischenprodukt im anaeroben Abbau der Algenbiomasse, zu gewinnen, wurde der respiratorische Index (RI) für die Umsetzung von $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Acetat}$ bestimmt. Der RI zeigte, dass mehr als 80 % des Acetats durch acetoklastische Spaltung zu Methan umgesetzt und nur ein geringerer Anteil zu Kohlendioxid oxidiert worden war. Zur Identifizierung der aktiv an diesen Prozessen beteiligten Mikroorganismen wurden Sedimentaufschlämmungen mit $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Acetat}$ inkubiert (RNA-SIP). Die Analyse der ^{13}C -markierten 16S rRNA zeigte, dass es zu einer starken Aktivierung archaeeller Populationen kam und *Methanosaeta* spp. für die acetoklastische Spaltung des Acetats verantwortlich waren. Obwohl nur ein geringer Anteil der *Bacteria* die ^{13}C -Markierung in ihre RNA inkorporiert hatte, ermöglichte RNA-SIP die Identifizierung dieser Bakterien. Die aktivsten wurden der *Thermodesulfovibrio*-, „*Magnetobacterium*“-Gruppe innerhalb des *Nitrospira*-Phylums zugeordnet. Weitere waren mit den *Burkholderiales* (*Ideonella*) und den *Rhodocyclales* (*Dechloromonas*-Subgruppe) innerhalb der *Betaproteobacteria* verwandt.

Neben der Charakterisierung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft eines Süßwasserseesediments konnten in dieser Arbeit *Bacteria* und *Archaea* identifiziert werden, die aktiv am anaeroben Abbau von Algenbiomasse und Acetat beteiligt waren. Insgesamt vertiefte diese Arbeit das Verständnis der Funktion mikrobieller Gemeinschaften in diesem Habitat.

I. Einleitung

1. Mikrobielle Ökologie von Süßwasserseen – Das Profundalsediment des See Genezareth als mikrobieller Lebensraum

Die Gesamtfläche von Süßwasserseen ($1,24 \times 10^6 \text{ km}^2$) beträgt ungefähr 1 % der gesamten Fläche des Festlandes. In einigen Teilen der Erde dienen Süßwasserseen als wichtige Trinkwasserreservoirs und Nahrungslieferanten. Der Nährstoffkreislauf von Süßwasserseen wird stark durch mikrobielle Prozesse in den oberen Sedimentschichten des Profundals beeinflusst, da das Profundalsediment von Süßwasserseen das Kompartiment des Ökosystems mit der höchsten Konzentration an chemischen Bestandteilen und mikrobieller Biomasse ist. Der Abbau und die Remineralisierung von organischem Material im Sediment durch Mikroorganismen zählen demzufolge zu den wichtigsten metabolischen Prozessen im Hinblick auf den Kohlenstoffkreislauf von Süßwasserseen (Nedwell, 1984) (Abbildung 1 und s. I.2).

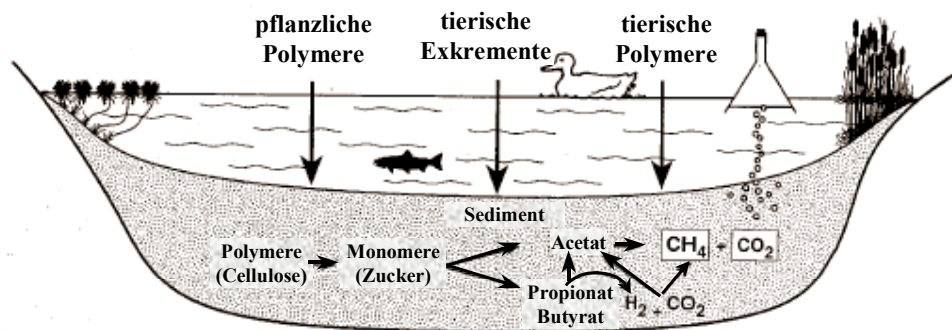


Abbildung 1: Skizzierung des anaeroben Abbaus von organischem Material im Sediment von Süßwasserseen (modifiziert nach Wolfe, R. S. (1996)).

Der See Genezareth (Lake Kinneret) liegt im nördlichen Teil des „Afro-Syrian Rift Valley“ in Israel 209 m unter dem Meeresspiegel. Er ist ein relativ großer Süßwassersee mit einer Fläche von ungefähr 170 km^2 und einem Volumen von $4 \times 10^9 \text{ m}^3$. Seine Wassertiefe liegt zwischen 25 m und 43 m. Das Hypolimnion an der tiefsten Stelle des Sees (Station A; Abbildung 4) weist eine konstante Jahrestemperatur von 15°C auf. Der pH-Wert im Hypolimnion liegt zwischen 7,5 und 7,8. Der See Genezareth ist ein meso- bis eutropher See mit einer jährlichen Primärproduktion von $610 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ (Berman et al., 1995). Als Wasserzulauf dient der Fluss Jordan im Norden des Sees und zahlreiche Quellen auf den angrenzenden Golanhöhen (Gophen und Nishri, 1994).

Der See Genezareth ist der einzige Süßwassersee in Israel und dient daher als wichtigstes Frischwasserreservoir für die Trinkwasserversorgung Israels. Durch die Nutzung des See Genezareth als Trinkwasserreservoir erfuhr das Ökosystem signifikante künstliche Modifikationen. Der Bau des National-Water-Carrier- (NWC) Systems im Jahr 1964 führte zu Veränderungen des Ausflussregimes und der Nährstoffdynamiken des Sees. Sowohl das stetige Abpumpen von ca. 10^6 m^3 Wasser pro Tag durch das NWC-System als auch Dürreperioden (1989-1991 und 1999) und starke Regenfälle während der Wintermonate (1992 und 2003) führten immer wieder zu starken Schwankungen des Wasserspiegels (Amplitude von 4,8 m), die ihrerseits Einfluss auf verschiedenste Parameter des Sees hatten ((Gophen, 2000), Jahresberichte 2003 des Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory). Durch die Konstruktion eines Entsalzungskanals im Jahr 1967 sank die Salinität des Sees von $395 \text{ mg Cl}^- \text{ l}^{-1}$ in den späten achtziger Jahren auf ungefähr $200 \text{ mg Cl}^- \text{ l}^{-1}$ ab (Gophen, 2000).

Der See Genezareth zeigt einen monomiktischen Mischungstyp (Gophen und Nishri, 1994). Die Umwälzung der Wassersäule beginnt im Dezember, wodurch sauerstoffreiches Wasser bis auf den Grund des Sees gelangt, so dass die oberen 2 mm des Profundalsediments kurzzeitig oxisch werden. Während der Phase der Stratifikation von Mai bis November hingegen, wird die Wassersäule durch sauerstoffverbrauchende Prozesse unterhalb von 20 m (Hypolimnion) strikt anaerob.

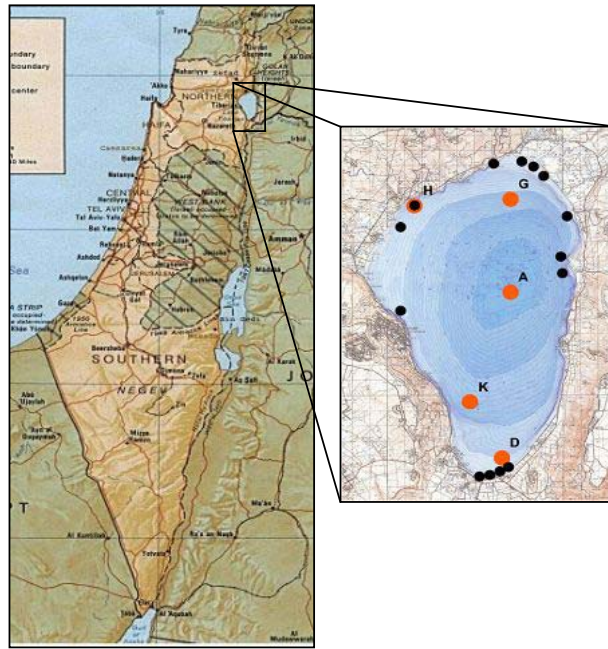


Abbildung 2: Karte von Israel mit Lage des See Genezareth und bathymetrische Karte vom See Genezareth mit Messstationen (orangene Punkte) im See.

Die oberen 0-4 cm des Profundalsediments bestehen an der tiefsten Stelle des Sees (zentrale Messstation, Station A) aus dunklem Material niedriger Dichte. Die tieferen Schichten setzen sich zum größten Teil aus Ton und Lehm zusammen (Abbildung 3) (Serruya et al., 1974). Diese Schichten sind durch einen hohen Prozentsatz an feinem, gekörntem Material charakterisiert, was auf die Dominanz von Montmorillonit (Schichtsilikat) im Lehm zurückzuführen ist. Durch den hohen Anteil von Calciumcarbonat (CaCO_3) (40-55 %) besitzt das Sediment eine gute Pufferwirkung (Serruya, 1971). Die Sulfatkonzentrationen im Hypolimnion reichen von $520 \mu\text{M}$ während der Durchmischung des Sees bis zu $200 \mu\text{M}$ am Ende der Stratifikation vor der erneuten Durchmischung im Dezember. Die Sulfatreduktionsraten variieren saisonbedingt von $12 \text{ nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ im Dezember bis $1700 \text{ nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ im Juli nach Eintrag des organischen Materials (Hadas und Pinkas, 1995). Die Acetatkonzentrationen des Profundalsediments liegen zwischen $25 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ (Nüsslein, 2000; Dissertation). Der größte Eintrag an organischem Material in das Profundalsediment erfolgt durch die Sedimentation von totem Algenmaterial nach der Algenblüte von *Peridinium gatunense* von Mai bis Juni ($187\text{-}209 \text{ g FG m}^{-2} \text{ y}^{-1}$) (Pollinger, 1986; Viner-Mozzini et al., 2003). Während dieser Zeit findet ebenfalls die Stratifikation des Sees statt, die zur Ausbildung des anoxischen Hypolimnions führt. Organisches Material, das in dieser Phase das Hypolimnion und das Profundalsediment erreicht, wird daher durch anaerobe mikrobielle Prozesse abgebaut und remineralisiert.



Abbildung 3: Sedimentkern vom Profundalsediment des See Geneareth von der zentralen Messstation (Station A).

2. Der anaerobe Abbau von organischem Material im Sediment von Süßwasserseen

Unter anaeroben Bedingungen wird organisches Material im Sediment von Süßwasserseen nach dem Durchlaufen mehrerer Zwischenstufen durch das Zusammenwirken metabolisch unterschiedlichster funktioneller Gruppen von Mikroorganismen vollständig zu den Endprodukten Methan und Kohlendioxid umgesetzt (Rudd und Hamilton, 1978; Rudd und Taylor, 1980).

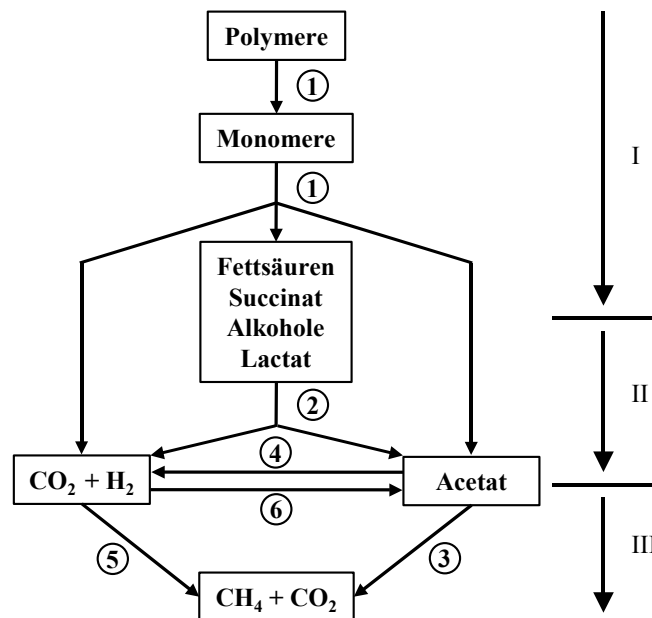


Abbildung 4: Schema des anaeroben Abbaus von organischem Material in Süßwasserseesedimenten (modifiziert nach Schink (1997)).

I, II, und III, Abbaustufen; (1) Primärgärer; (2) Sekundärgärer (Syntrophe); (3) Acetatspaltende (acetoklastische) Methanogene; (4) Syntroph acetatoxidierende Bakterien; (5) H₂-oxidierende (hydrogenotrophe) Methanogene; (6) Homoacetogene.

Zunächst werden Biopolymere zu Monomeren wie einfache Zucker und Aminosäuren hydrolysiert. Durch anschließende Fermentation durch sogenannte Primärgärer entstehen Alkohole und Fettsäuren (Abbildung 4). Zu den wesentlichsten Gärungsprodukten zählen Acetat, Propionat, Butyrat, Succinat, Alkohole, Wasserstoff und Kohlendioxid. Acetat bzw. Wasserstoff und Kohlendioxid sind hierbei die wichtigsten direkten Vorstufen für die Methanogenese (Zehnder, 1978; Zehnder und Brock, 1979). In anoxischen Süßwasserseesedimenten tragen Acetat bzw. Wasserstoff und Kohlendioxid gewöhnlich in einem Verhältnis von 2:1 oder höher zur Produktion von Methan bei (Conrad, 1999). Acetat dient hierbei als Substrat acetoklastischer methanogener *Archaea*. Wasserstoff und Kohlendioxid werden dagegen von hydrogenotrophen methanogenen *Archaea* zur Produktion von Methan genutzt. Wasserstoff und Kohlendioxid können allerdings außer

von Methanogenen auch von Homoacetogenen als Substrat verwendet werden, wodurch es zu einer Konkurrenz dieser beiden Prozesse kommen kann. Neben der Methanogenese und der Homoacetogenese können in Anwesenheit entsprechender alternativer anorganischer Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat, oxidiertes Mangan und Eisen) zusätzlich respiratorische Abbauprozesse eine Rolle in anaeroben Habitaten spielen. Der thermodynamischen Theorie folgend werden zunächst die Elektronenakzeptoren mit dem höchsten Redoxpotential reduziert (Ponnamperuma, 1972). Die sequentielle Abfolge der Reduktionsprozesse hängt außerdem von unterschiedlichen Affinitäten und verschiedenen minimalen verwertbaren Schwellenkonzentrationen des gemeinsam nutzbaren Substrates ab (Kristjansson et al., 1982; Lovley, 1985; Cord-Ruwisch et al., 1988; Achtnich et al., 1995). Wenn die Substrate in nicht-limitierenden Konzentrationen vorliegen, ist jedoch auch eine simultane Reduktion von Nitrat, Sulfat, Mn(IV) und Fe(III) sowie die Produktion von Methan möglich (Mountfort und Asher, 1981; Holmer und Kristensen, 1994). In Süßwasserseesedimenten tritt vor allem die Sulfatreduktion in direkte Konkurrenz zur Methanogenese um die Substrate Acetat und Wasserstoff (Capenberg und Prins, 1974; Capone und Kiene, 1988; Kuivila und Lovley, 1996).

In Abwesenheit oder bei geringer Verfügbarkeit anorganischer Elektronenakzeptoren, kann der Abbau von Acetat und der anderen im Primärgärungsprozess entstandenen Fettsäuren zusätzlich durch syntrophe wasserstoffproduzierende, fettsäureoxidierende Bakterien erfolgen (Zinder, 1994). Die anaerobe Oxidation von Fettsäuren durch Sekundärgärer ist energetisch jedoch nur durch die Kopplung an einen wasserstoffverbrauchenden Prozess wie die hydrogenotrophe Methanogenese möglich, die einen ständig niedrigen Wasserstoffpartialdruck gewährleistet (Thauer et al., 1977; Bryant, 1979). Als ein weiteres Phänomen wurde die Oxidation von Acetat und Wasserstoff mit Huminstoffen als Elektronenakzeptoren für anoxische Sedimente von Süßwasserseen beschrieben (Lovley et al., 1996). Diese Reduktion von Huminstoffen ist jedoch nur gekoppelt an eine abiotische Reduktion von biologisch weniger zugänglichen Elektronenakzeptoren, wie unlöslichen Fe(III)-Oxiden, möglich, indem die Huminstoffe die Elektronen zu den biologisch weniger zugänglichen unlöslichen Fe(III)-Oxiden befördern (Lovley et al., 1996). Zwei weitere häufige anaerobe Prozesse in Süßwasserseesedimenten, in denen Acetat und Wasserstoff als Elektronendonatoren dienen, sind die reduktive Dechlorierung chlorierter Kohlenwasserstoffe (Dehalorespiration) (Holliger et al., 1998) und die Reduktion von Perchlorat bzw. Chlorat (Coates et al., 1999; Bender et al., 2004).

3. Die mikrobielle Gemeinschaft im Sediment von Süßwasserseen

Die mikrobielle Ökologie beschäftigt sich mit der Identifizierung und Funktion von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung. Die ersten Studien, die sich mit der mikrobiellen Ökologie von Süßwasserseesedimenten beschäftigten, konzentrierten sich auf biogeochemische Prozessmessungen und die Isolierung von Mikroorganismen. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte mittels Selektivmedien und die Quantifizierung wurde gewöhnlich mit Hilfe der „Most-Probable-Number“-Methode (MPN) durchgeführt. In den letzten Jahren hat sich jedoch auch für dieses Ökosystem herausgestellt, dass nur eine umfassende Analyse der Struktur und phylogenetischen Diversität der kompletten mikrobiellen Gemeinschaft die Voraussetzung für ein besseres Verständnis der mikrobiellen Prozesse in diesem Habitat darstellt.

Abhängig vom Ökosystem können mit Hilfe der Isolierungsmethode nur 0,001 bis 15 % der insgesamt sichtbaren Bakterienzellen kultiviert werden (Amann et al., 1995). Der kultivierbare Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft ist daher weder quantitativ noch qualitativ repräsentativ für das jeweilige Ökosystem. Aus diesem Grund kann die traditionelle Kultivierungsmethode nicht für eine umfassende Analyse der phylogenetischen Diversität mikrobieller Gemeinschaften herangezogen werden. Erst die Verwendung molekularbiologischer Methoden, insbesondere die auf dem phylogenetischen Markergen der 16S rRNA basierenden Methoden (Woese, 1987; Amann et al., 1995; Woese, 2000; Hugenholtz, 2002), ermöglichten eine umfassendere Analyse der phylogenetischen Diversität komplexer mikrobieller Gemeinschaften in verschiedenen Ökosystemen (Head et al., 1998; Hugenholtz et al., 1998a; Torsvik und Ovreas, 2002). Eine routinemäßig angewandte Methode zur Untersuchung der phylogenetischen Diversität mikrobieller Gemeinschaften besteht in der Erstellung von Klonbibliotheken für das 16S rRNA-Gen und vergleichender Sequenzanalyse, die eine phylogenetische Zuordnung von Sequenzen zu bereits bekannten phylogenetischen Gruppen erlaubt (Felske et al., 1996; Hugenholtz et al., 1998a; Hugenholtz et al., 1998b). Auf die ökologische Signifikanz der mittels 16S rRNA-Gen-Sequenzen identifizierten Mikroorganismen in einem Habitat kann mit diesem auf DNA basierenden molekularbiologischen Ansatz jedoch nicht direkt geschlossen werden, da von DNA bekannt ist, dass diese auch für längere Zeit in ruhenden, sterbenden und toten Zellen überdauern sowie als extrazelluläre DNA vorkommen kann (Ogram et al., 1987; Coolen und Overmann, 1998). Die auf 16S rRNA-Genen basierenden Ansätze zur Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft eines Habitats geben daher eher

das genetische Potential dieses Ökosystems wieder. Im Gegensatz zu DNA ist RNA sehr labil und der Gehalt an ribosomaler RNA in einer Zelle ist abhängig von ihrem physiologischen Zustand. Aus diesem Grund wurde die Anzahl an Ribosomen, und demzufolge die Anzahl an 16S rRNA-Molekülen, in einer Zelle als Maß für deren Aktivität aufgefasst (Rosset et al., 1966; Nomura et al., 1984; Kemp et al., 1993; Molin und Givskov, 1999). Daher können im Gegensatz zu DNA-gestützten Analysen, rRNA-gestützte Analysen ein repräsentativeres Bild der metabolisch aktiven Mitglieder einer mikrobiellen Gemeinschaft wiedergeben (Pichard und Paul, 1993; Teske et al., 1996).

Neben der Klonierung und vergleichenden Sequenzanalyse wurden zur Charakterisierung komplexer mikrobieller Gemeinschaften auch molekulare Fingerabdruckmethoden („Fingerprint“) basierend auf 16S rRNA-Genen oder revers-transkribierter 16S rRNA wie die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) (Wawer und Muyzer, 1995; Muyzer, 1999), die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) (Lee et al., 1996) und der terminale Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP) (Liu et al., 1997) entwickelt. Diese Fingerabdruckmethoden ermöglichen einen schnellen Vergleich der Diversität, der strukturellen Zusammensetzung sowie der Dynamik verschiedener komplexer mikrobieller Gemeinschaften bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz. Die in dieser Arbeit eingesetzte T-RFLP-Methode wurde bereits vielfach erfolgreich zur Charakterisierung komplexer bakterieller und archaeeller Gemeinschaften in verschiedenen Ökosystemen verwendet (Chin et al., 1999; Blackwood et al., 2003; Glissmann et al., 2004). Neben einer Analyse der Zusammensetzung hoch diverser mikrobieller Gemeinschaften ermöglichte die Anwendung der T-RFLP-Methode auch die Aufklärung struktureller, d. h. sowohl räumlicher als auch zeitlicher Unterschiede in komplexen bakteriellen Gemeinschaften (Lukow et al., 2000; Lüdemann et al., 2000; Noll et al., 2005).

Die mikrobielle Gemeinschaft von Süßwasserseesedimenten wurde bisher nur in wenigen molekularbiologischen Studien untersucht und beschränkte sich weitgehend auf Untersuchungen der phylogenetischen Diversität anhand von Klonbibliotheken basierend auf 16S rRNA-Genen bzw. 16S rRNA oder auf Untersuchungen verschiedener Subpopulationen, wie den methanogenen *Archaea* (Chan et al., 2005), den Methanotrophen (Costello und Lidstrom, 1999) oder den sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) (Li et al., 1999). Die Struktur, d. h. die phylogenetische Diversität und die relative Zusammensetzung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft ist dagegen bisher weitgehend unerforscht.

4. Bedeutung stabiler Isotope in der mikrobiellen Ökologie

Obwohl die methodischen Weiterentwicklungen der letzten Jahre auf dem Gebiet der Molekularbiologie die Identifizierung von Mikroorganismen immer stärker vereinfacht haben, und somit zu einem stetigen Anstieg von verfügbaren Daten über die phylogenetische Diversität der verschiedensten Habitate führten, beschränkt sich das Wissen über ihre Funktion im jeweiligen Habitat auf Flussmessungen direkt am Standort oder in Modellinkubationen (Mikrokosmen) und auf physiologische Untersuchungen von meist entfernt verwandten, bereits kultivierten Isolaten. Die größte Herausforderung der mikrobiellen Ökologie besteht daher gegenwärtig in der direkten Verknüpfung von erhobenen phylogenetischen Daten eines Habitats mit gemessenen biogeochemischen Prozessen, d. h. mit der Funktion dieser identifizierten Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung. Um diese Verknüpfung herzustellen, werden zur Zeit eine Vielzahl von kultivierungsunabhängigen Methoden eingesetzt (Boschker und Middelburg, 2002). Die Verwendung von stabilen Isotopen, insbesondere des stabilen Isotops des Kohlenstoffs (^{13}C), als „Tracer“ zur Analyse von Biomarkern bei gleichzeitiger Analyse der ablaufenden biogeochemischen Prozesse, stellt eine dieser vielversprechenden Techniken dar.

Das stabile Isotop des Kohlenstoffs (^{13}C) kommt natürlicherweise mit einem Anteil von 1,1 % vor, der weitaus größere Anteil entfällt auf das ^{12}C -Isotop. Der Massenunterschied der zwei Kohlenstoffisotope ist für leicht veränderte Bindungs- und Vibrationsenergien verantwortlich (de Vries, 2005) und führt daher während biologischer Reaktionen, bei denen es sich meistens nicht um Gleichgewichtsreaktionen handelt, zu einem Isotopeneffekt, der zu einer Diskriminierung des schwereren ^{13}C -Isotops gegenüber dem leichteren ^{12}C -Isotop und somit zu einer Anreicherung des leichteren ^{12}C -Isotops in den Produkten führt. Isotopeneffekte sind physikalische Phänomene, die nicht direkt beobachtet werden können. Quantitativ messbar hingegen ist die Folge des Isotopeneffekts, die Isotopenfraktionierung, die einen charakteristischen Wert für eine bestimmte Reaktion besitzt. Die Analyse des natürlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses einer Verbindung mittels eines Gaschromatographen mit integriertem Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometers (GC-IRMS) ist daher eine vielfach angewandte Methode, um die Isotopenfraktionierung während verschiedenster biogeochemischer Prozesse, wie Primärproduktion, Respiration und Assimilation zu messen (Hayes, 2001). Die Analyse des natürlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses kann somit Rückschlüsse auf die durch Mikroorganismen abgebaute und assimilierte Kohlenstoffquelle geben (Boschker et al.,

1999) und erlaubt zum Teil die Identifizierung der in einem spezifischen metabolischen Prozess beteiligten Mikroorganismen (z. B. Methanotrophe (Hinrichs et al., 1999)).

In der mikrobiellen Ökologie fand jedoch auch der Einsatz von stabilen Isotopen als „Tracer“ bereits vielfache Anwendung, wie bei der Messung von Raten (z. B. Denitrifikation und Stickstofffixierung (^{15}N), Kohlenstofffixierung und Respiration (^{13}C)). Die Kombination von bewusst eingesetzten „Tracern“ mit der isotopischen Analyse von Biomarkern stellt nun eine hervorragende Möglichkeit dar, um mikrobielle Identität (Biomarker) direkt mit einer detektierten Aktivität (Assimilation des Isotops) in Verbindung zu bringen. Diese Methodik ist vielseitig einsetzbar, da die ^{13}C -Markierung in verschiedenster Form zugesetzt werden kann, als [^{13}C]-Bicarbonat oder $^{13}\text{CO}_2$, als ^{13}C -markierte Organismen (z. B. Bakterien oder Algen oder deren Überreste wie Blätter) oder als jede andere organische Verbindung wie z. B. [^{13}C]-Acetat (Boschker und Middelburg, 2002).

Eine neue Technik zur Charakterisierung der Struktur und *in situ* Funktion aktiver, mikrobieller Gemeinschaften ist das Stable-Isotope-Probing (SIP) (Manefield et al., 2002a; Manefield et al., 2002b; Dumont und Murrell, 2005) (Abbildung 5). Diese Methode ermöglicht es durch den Einsatz ^{13}C -markierter Substrate, einzelne Mitglieder einer Gemeinschaft direkt mit bestimmten metabolischen Prozessen in Verbindung zu bringen. Die SIP-Technik basiert auf der Assimilation des stabilen bzw. „schweren“ Kohlenstoffisotops des ^{13}C -markierten Substrates in die Zellbestandteile von Mikroorganismen, die an der Umsetzung dieses Substrats beteiligt sind (Radajewski et al., 2000). Das zusätzliche Neutron des ^{13}C -Atoms ermöglicht es, alle Zellbestandteile, in die das „schwere“ Isotop eingebaut wurde, aufgrund der Massendifferenz zu ihren ^{12}C -Gegenständen ($^{12}\text{C} \equiv$ nicht-markiert), von diesen zu separieren. Die Verwendung von Nukleinsäure, insbesondere die Untersuchung des 16S rRNA-Gens (DNA-SIP), als markierten Biomarker, ermöglicht eine hohe phylogenetische Auflösung der zugrunde liegenden, aktiv an der Umsetzung des ^{13}C -markierten Substrats beteiligten, mikrobiellen Gemeinschaft (Radajewski et al., 2000).

Eine Weiterentwicklung der SIP-Methode ist die Verwendung des 16S rRNA-Moleküls selbst (RNA-SIP). Dieser Ansatz kombiniert die Stärken des DNA-SIPs mit den Vorteilen eines „high-copy“ Biomarkers (s. Tabelle 1), dessen Umsetzung unabhängig von der Zellreplikation ist und dessen Menge in der Zelle mit deren Aktivität korreliert (Rosset et al., 1966; Nomura et al., 1984; Kemp et al., 1993; Molin und Givskov, 1999).

Die selektive Isolierung der ^{13}C -markierten RNA erfolgt durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation, mittels dieser die „schwerere“ ^{13}C -markierte RNA der Mikroorganismen, die an der Umsetzung des ^{13}C -Substrates beteiligt waren, unter der nicht-markierten RNA im Gradienten angeordnet wird (Abbildung 5). Die Auftrennung der RNA erfolgt mit Hilfe von Cäsiumtrifluoroacetat (CsTFA) als Gradientenmedium (Manefield et al., 2002a). CsTFA besitzt im Vergleich zu dem bei der Auftrennung von DNA verwendeten Cäsiumchlorid (CsCl) eine geringere Ladekapazität, weshalb nach der Auftrennung von RNA keine Visualisierung einer distinkten ^{13}C - und ^{12}C -Bande ($^{12}\text{C} \equiv$ nicht-markiert) im Gradienten mit Hilfe nukleinsäurefärbender Stoffe möglich ist (Lueders et al., 2004a). Daher müssen RNA-Gradienten fraktioniert und anschließend jede Fraktion einzeln auf ihren RNA-Gehalt hin untersucht werden. Die Quantifizierung der Ribonukleinsäure (16S rRNA) in den erhaltenen Fraktionen kann mit Hilfe einer an eine reverse Transkription gekoppelte quantitative „real-time“-PCR mit domänenspezifischen (*Bacteria* und *Archaea*) Primern erfolgen (Lueders et al., 2004a). Die Struktur und phylogenetische Diversität der ^{13}C -markierten und nicht-markierten mikrobiellen Gemeinschaft kann mittels 16S rRNA-gestützter Fingerabdruckmethoden („Fingerprint“), wie der terminalen Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP-Analyse), in Kombination mit vergleichender Sequenzanalyse untersucht werden (Murrell und Radajewski, 2000), wodurch eine Identifizierung der aktiv an der Umsetzung des Substrats beteiligten Mikroorganismen ermöglicht wird.

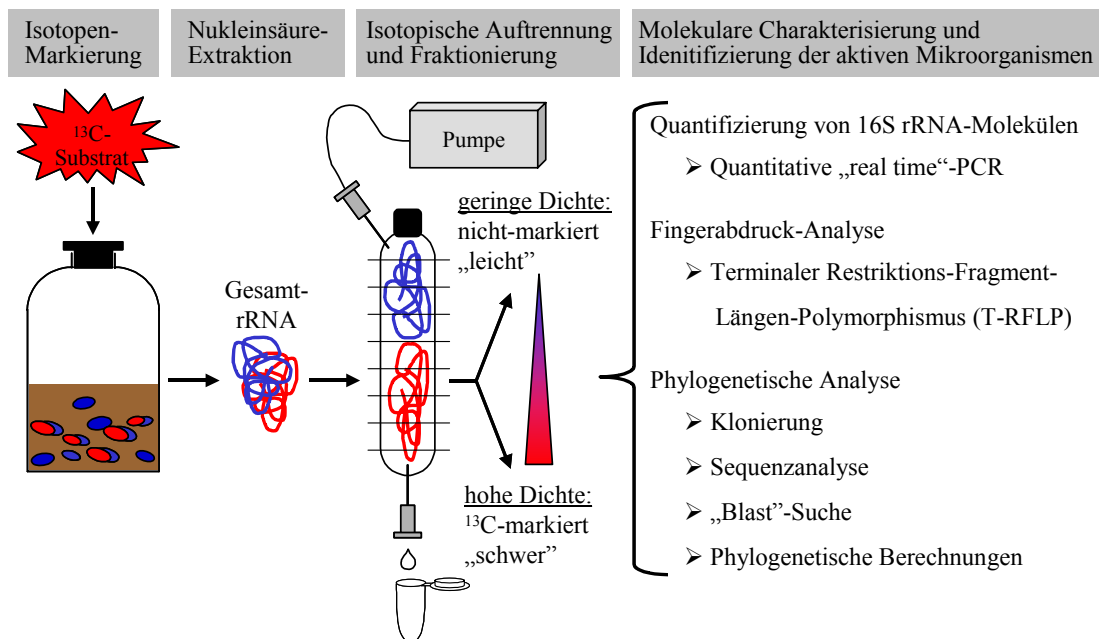


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Stable-Isotope-Probing-Technik basierend auf 16S rRNA.

Tabelle 1: Aspekte des 16S rRNA-Moleküls, die zum großen Potential von rRNA-basierenden Analysen in der mikrobiellen Ökologie beitragen (nach Whiteley et al., 2006).

-
- ✓ Essentiell und ubiquitär.
 - ✓ Komplexes Molekül mit Kapazität zur Variation ohne Funktionsverlust.
 - ✓ Eines der häufigsten Moleküle in der Zelle bezogen auf die Masse der Zelle.
 - ✓ Häufigkeit ist gekoppelt an die Proteinsynthese, die ein Maß für die Aktivität der Zelle darstellt.
 - ✓ Turnover ist unabhängig von der Zellreplikation.
 - ✓ Umfangreiche Datenbanken mit 16S rRNA-Sequenzen sind verfügbar.
 - ✓ Es stehen verschiedene Methoden zur Unterscheidung und Quantifizierung der 16S rRNA zur Verfügung.
-

5. Ziele dieser Dissertation

Die anoxischen Sedimentschichten des Profundals von Süßwasserseen sind die Hauptorte des anaeroben Abbaus und der Remineralisierung von organischem Material durch Mikroorganismen. Dabei entsteht aus organischem Material, wie z. B. Algenbiomasse, das zentrale Zwischenprodukt Acetat, welches anaerob zu Kohlendioxid oxidiert wird oder als Substrat für die Methanogenese dienen kann. Welche Mikroorganismen diesen Prozessen zugrunde liegen, ist jedoch bisher weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war daher, am Beispiel des Profundalsediment des See Genezareth die mikrobiellen Populationen zu identifizieren, die für diese Prozesse verantwortlich sind.

Um das genetische Potential der mikrobiellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth zu beschreiben, sollte zunächst die Abundanz der *Bacteria* und *Archaea* mittels quantitativer „real-time“-PCR bestimmt werden. Des Weiteren sollte die Struktur und phylogenetische Diversität der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft anhand ihrer 16S rRNA-Gene mittels der molekularen Fingerabdruckmethode T-RFLP kombiniert mit vergleichender Sequenzanalyse charakterisiert werden.

Die Identifizierung der aktiv acetatverwertenden mikrobiellen Populationen sowie der aktiv am anaeroben Abbau von Algenbiomasse beteiligten mikrobiellen Populationen sollte dann mit Hilfe ^{13}C -markierter Substrate ($[^{13}\text{C}]$ -Acetat bzw. $[^{13}\text{C}]$ -markierte *Peridinium gatunense*-Zellen) und RNA-SIP, basierend auf 16S rRNA, erfolgen. Der Einsatz des stabilen Kohlenstoffisotops ^{13}C sowie die Kombination biogeochemischer Prozessmessungen mit molekularen Analysen sollten Einblicke in den Kohlenstofffluss innerhalb des anaeroben Nahrungsnetzes und eine direkte Verknüpfung biogeochemischer Prozesse mit phylogenetischen Gruppen der *Archaea* und *Bacteria* ermöglichen.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), B. Braun Biotech International (Melsungen), BioRad Laboratories (München), Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf), Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA), Eppendorf AG (Hamburg), Eurobio Les Ulis Cedex B (Frankreich), Fluka (Buchs; Schweiz), Invitrogen (Freiburg), Merck (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Folgende Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Frankfurt) bezogen:

Eichgase (in Stickstoff)

Wasserstoff (2 ppm_v)

Gasgemisch aus Kohlenmonoxid, Kohlendioxid und Methan (jeweils 1000 ppm_v)

Gase für Inkubationsexperimente und Kulturen

Argon 4.8 (>99,998 Vol. %)

Stickstoff 4.6 (>99,996 Vol. %)

Gasgemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid (N₂:CO₂, 80:20 [v/v])

Gasgemisch aus Wasserstoff und Kohlendioxid (H₂:CO₂, 80:20 [v/v])

2. Sterilisationsverfahren

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren bei 121°C und 2 atm für 30 min sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden sterilfiltriert (Sterilfilter Nr. FP 30/0,2 CA-5, 0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) und unter aseptischen Bedingungen zugesetzt. Für Kulturen und Inkubationen verwendete Glasmaterialien, Stopfen und Verbindungsstücke wurden vor Benutzung autoklaviert (30 min bei 121°C und 2 atm).

3. Mikroorganismen

3.1 Prokaryoten

Die Referenzorganismen, deren DNA bzw. RNA entweder als Standard für die Quantifizierung von DNA- bzw. RNA-Extrakten oder als Positivkontrolle in spezifische PCR-Nachweissysteme eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Als Standard für die Quantifizierung von DNA- bzw. RNA-Extrakten und als Positivkontrollen in spezifische PCR-Nachweissysteme eingesetzte Referenzorganismen und Referenz-DNA-Extrakte.

Bezeichnung	Phylogenetische Einordnung	Quelle
DSMZ 864	<i>Methanospirillum hungatei</i>	DSMZ, Braunschweig; (Ferry et al., 1974)
JM 300	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Braker, G., Tiedje, J.M., Michigan State Uni., USA
	<i>Escherichia coli</i> K12	Chromosomale DNA; Roche Diagnostic
AM086113	16S rRNA-Gen von <i>Syntrophus</i> spp. in <i>Escherichia coli</i> K12	Umweltsequenz aus Klonbibliothek c5LKS (s. Anhang A, Tabelle 32)
DSMZ 804	<i>Methanosarcina barkeri</i>	DSMZ, Braunschweig

3.1.1 Süßwasser-Medium für die Anzucht von Referenzorganismen

Die folgenden Lösungen sind Bestandteile des Süßwasser-Mediums nach Widdel und Bak (1992), in leicht modifizierter Art, das der Anzucht der unter II.3.1 aufgeführten Referenzorganismen diene.

Lösung 1 (Basis-Medium)

NaCl	1 g
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,4 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1 g
NH ₄ Cl	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,5 g

Die Mineralsalze des Basis-Mediums wurden in 960 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Lösung 2

Resazurin	0,5 g l ⁻¹	(Endkonz. 0,5 mg l ⁻¹)
-----------	-----------------------	------------------------------------

Lösung 3 (Spurenelement-Lösung SL 10a) (Whittenbury et al., 1970)

$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	2 g
ZnCl_2	0,14 g
$\text{MnCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,16 g
H_3BO_3	0,012 g
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,26 g
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,004 g
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,048 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,072 g

Zur Herstellung der SL 10a Spurenelementlösung wurde zunächst $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ in 2,5 ml 2 M HCl gelöst. Anschließend wurden die übrigen Komponenten (s.o.) zugefügt und die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, wodurch sich eine 200fach konzentrierte Lösung ergab.

Lösung 4 (Se/Wo-Lösung) (Tschech und Pfennig, 1984)

NaOH	0,5 g l ⁻¹
$\text{Na}_2\text{SeO} \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,003 g l ⁻¹
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,004 g l ⁻¹

Lösung 5

NaHCO_3	63 g l ⁻¹	(Endkonz. 30 mM)
------------------	----------------------	------------------

Das NaHCO_3 wurde unter ständigem Begasen mit einem Gemisch aus N_2/CO_2 (80:20 [v/v]) gelöst und in einer gasdichten Flasche gelagert.

Lösung 6

Na_2S -Lösung	18 g l ⁻¹	(Endkonz. 1,5 mM)
-------------------------------	----------------------	-------------------

Das als Reduktionsmittel eingesetzte Na_2S wurde unter ständigem Begasen mit Stickstoff gelöst und anschließend mit einer Spritze in eine autoklavierte, mit Stickstoff begaste Serumflasche sterilfiltriert.

Lösung 7 (Vitamin-Lösung)

p-Aminobenzoesäure	40 mg l ⁻¹
Biotin	10 mg l ⁻¹
Liponsäure	10 mg l ⁻¹
D-Ca-Pantothensäure	100 mg l ⁻¹
Vitamin B6	100 mg l ⁻¹
Nikotinsäure	50 mg l ⁻¹
Folsäure	30 mg l ⁻¹
Vitamin B12	50 mg l ⁻¹
Vitamin B1	10 mg l ⁻¹
Vitamin B2	50 mg l ⁻¹

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und in 50 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Präparation des Mediums erfolgte in modifizierter Art wie von Scholten und Conrad (2000) beschrieben. Zum Basis-Medium (Lösung 1) wurden 1 ml der Lösung 2, 10 µl der Lösung 3 und 1 ml der Lösung 4 gegeben. Jeweils 48 ml dieses Gemisches wurden in 120-ml Serumflaschen abgefüllt und mit Butylgummistopfen verschlossen. Die Gasphase wurde dann entweder gegen ein Gasgemisch aus N₂/CO₂ (80:20 [v/v]) oder H₂/CO₂ (80:20 [v/v]) ausgetauscht. Es wurde ein Überdruck von 1 bar eingestellt. Vor dem Autoklavieren wurden 2 ml der Lösung 5 und 100 µl des Reduktionsmittels (Lösung 6) mit einer Spritze zugegeben. Anschließend folgte das Autoklavieren des Mediums bei 121°C für 30 min. Die Vitamine (50 µl in 50 ml Medium) und Kohlenstoffquelle (Natriumacetat: 1 mM für *Methanospirillum hungatei*; 10 mM für *Methanosarcina barkeri*) wurden erst direkt vor dem Beimpfen steril hinzugefügt. Der pH-Wert des Mediums betrug nach dem Fertigstellen des Mediums 7,2 bis 7,4.

3.2 Eukaryoten (*Peridinium gatunense*)

Zur Untersuchung des anaeroben Abbaus von Biomasse im Profundalsediment des See Genezareth wurde *Peridinium gatunense* herangezogen (Pollinger, 1986). Die Anzucht von *P. gatunense* wurde in einem Nährmedium, modifiziert nach Lindstrom (1985), von Werner Eckert am Yigal Allon Limnological Laboratory in Israel durchgeführt. Alle Komponenten wurden in vierfacher Konzentration eingesetzt. Um eine ^{13}C -Markierung der Zellen für das RNA-SIP (s. V6, II.7.1.5) zu erreichen, wurde dem Medium 1 mM ^{13}C - NaHCO_3 (ISOTECTM, Miamisburg, USA) hinzugefügt. Die Kontrollzellen wurden in Medium mit 1 mM nicht-markiertem Bicarbonat (NaHCO_3) angezogen. Die Anwuchszeit betrug vier Wochen in einem Inkubator bei 20°C und einem Licht-Dunkelzyklus von sechs Stunden. Das Abernten erfolgte mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch ein 2,5 μm Netz. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei -53°C in einem Lyophilisierer (HETO LyoLab 3000) gefriergetrocknet.

Die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der in Bicarbonatmedium angezogenen und anschließend gefriergetrockneten Zellen wurde am Forschungszentrum für Waldökologie (FZW) im Kompetenzzentrum für Stabile Isotope (KOSI) in Göttingen an einem IRMS (Delta+, Finnigan Mat) gekoppelt mit einem Elementanalysator (EA 1108, Fisons) durchgeführt (Tabelle 3). Da die Anzucht der nicht-markierten und ^{13}C -markierten Zellen zeitgleich im selben Inkubator erfolgte, kam es zu einer leichten ^{13}C -Markierung der nicht-markierten Zellen durch in die Gasphase übergegangenes $^{13}\text{CO}_2$ aus dem ^{13}C -Bicarbonatmedium. Dies führte zu einer leichten Erhöhung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes der nicht-markierten Zellen auf 153 ‰. Der natürliche $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von im See gewachsenen *P. gatunense*-Zellen liegt normalerweise zwischen -18 und -23 ‰ (Zohary et al., 1994).

Tabelle 3: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur der gefriergetrockneten *Peridinium gatunense*-Zellen.

Bezeichnung	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	SE	Anteil an ^{13}C [atm %]	SE
<i>Peridinium gatunense</i> ^a	-18 bis -23	—	1,108	—
nicht-markierte <i>Peridinium gatunense</i> ^b	153	2,9	1,235	0,003
^{13}C -markierte <i>Peridinium gatunense</i> ^c	17423	50,2	16,646	0,038

SE: Standardfehler von jeweils drei Messungen derselben Probe.

^a Die Zellen wurden direkt aus dem See gewonnen und gefriergetrocknet; freundlicherweise von Tamar Zohary zur Verfügung gestellt.

^b Die Zellen wurden in Medium mit nicht-markiertem Bicarbonat angezogen.

^c Die Zellen wurden in Medium mit ^{13}C -Bicarbonat angezogen.

4. Chemische und physikalische Methoden

4.1 Bestimmung des pH-Wertes

Die Bestimmung des pH-Wertes der Sedimentproben erfolgte durch direkte Messung mit einer Glaselektrode (Mettler TOLEDO, In Lab® 427) und einem pH-Meter (Microprocessor pH Meter, pH 539 WTW) in der Probe.

4.2 Analyse organischer Säuren (HPLC)

Die Konzentration von organischen Verbindungen (Fettsäuren) im Porenwasser von Sedimentproben wurde mittels eines HPLC-Systems (Sykam, Gilching) bestimmt. Proben des unbehandelten Sediments und von inkubierten Sedimentaufschlämmungen wurden vor der Lagerung bei -20°C für 10 min bei 4°C mit 20000 g abzentrifugiert und der Überstand durch $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Membranfilter (Rezist 13/0,2 PTFE, Schleicher und Schuell) filtriert. Als Eluent wurde 1 mM Schwefelsäure verwendet. Als Eichstandard diente eine 1 mM Mischung der Natriumsalze von Citrat, Malat, Lactat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Isovalerat, Valerat, Succinat und Capronat. Die Auswertung erfolgte mittels eines Computers mit dem Integrationsprogramm Peakwin (PeakSimple Version 2.66, SRI Inc.).

Tabelle 4: Geräteparameter der HPLC-Anlage.

Säule	30 cm Edelstahlsäule, \varnothing 7,8 mm Trägermaterial: ORH-801 Ion-exclusion form, H^+ (Interaction, Vertrieb Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Säulenofen	S4110
Pumpe	S1000
Detektoren	Brechungsindex- (RI-) Detektor 2000F (Schambeck, Bad Honnef) UV-Detektor Linear UVIS 3200 (Sykam), Wellenlänge: 205 nm
Autosampler	S5200 (Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Flussrate	$0,5\text{ ml min}^{-1}$
Temperatur	Säule: 65°C RI-Detektor: 40°C

4.3 Analyse anorganischer Ionen (Ionenchromatographie)

Die Chlorid-, Sulfat-, Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen im Sedimentporenwasser wurden mit Hilfe eines Ionenchromatographen-Systems (Sykam, Fürstenfeldbruck) ermittelt (Tabelle 5). Die Sedimentproben wurden vor der Lagerung bei -20°C für 10 min bei 4°C mit 20000 g abzentrifugiert und der Überstand durch einen $0,2\text{ }\mu\text{m}$ N-freien Membranfilter (Minisart RC 15, PP-housing, Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Ein Liter des verwendeten Eluenten setzte sich aus einer 5 mM Na_2CO_3 -Lösung und 1 ml Modifier (1 g 4-Hydroxybenzonitril in 100 ml Methanol) zusammen. Als Eichstandard diente eine 1 mM Lösung der Natriumsalze von Chlorid, Bromid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat. Die Auswertung erfolgte mittels eines Computers mit dem Integrationsprogramm Peakwin (PeakSimple Version 2.66, SRI Inc.).

Tabelle 5: Geräteparameter der IC-Anlage.

Säule	6 cm Edelstahlsäule, \varnothing 4,6 mm Trägermaterial: Styrol/Divinobenzol, 10 μm Korngröße
HPLC-Pumpe	S1121
Suppressorsystem	S4260A + S4260B mit Trennsäule, LCA A14; 2,5 cm, \varnothing 3 mm
Eluent	5 mM Na_2CO_3 + Modifier
Flussrate	1,5 ml min ⁻¹
Detektoren	Leitfähigkeitsdetektor S3111UV/VIS Detektor (UVIS 3200, Sykam)
Reagent Organizer	S7121
Autosampler	S5200
Temperatur	Säule: 70°C

4.4 Gaschromatographische Analysen

Vor jeder Gasanalyse wurden die Proben von Hand geschüttelt, um ein Gleichgewicht der Gase zwischen flüssiger Phase und Gasphase zu erhalten. Die Auswertung der Messungen von Methan, Kohlendioxid und Wasserstoff erfolgte durch Integration der Peakflächen mit einem Chromatopac C-R6A-Integrator der Firma Shimadzu.

4.4.1 Messung von Methan und Kohlendioxid

Zur Bestimmung von Methan und Kohlendioxid wurde ein Gaschromatograph (GC) mit Flammenionisationsdetektor (FID) der Firma Shimadzu (Tabelle 6; GC-8A, Kyoto, Japan) verwendet. Für die Bestimmung von Kohlendioxid diente ein hinter der Trennsäule angeschlossener Methanisator, in dem Kohlendioxid und Kohlenmonoxid zu Methan reduziert wurden. Die Eichung wurde als 1-Punkt-Eichung mit einer 100 µl Pressure-Lock-Spritze (VICI, Baton Rouge LA, USA) durchgeführt. Als Eichgas diente ein Gasgemisch aus jeweils 1000 ppm_v Kohlendioxid, Kohlenmonoxid und Methan in Stickstoff.

Tabelle 6: Geräteparameter des Gaschromatographen GC-8A.

Säule	2 m Edelstahlsäule, Ø 1/8'', Trägermaterial: Poropack QS 50/100 mesh
Trägergas	Wasserstoff 5.0
Detektor	FID, Brenngase: FID-Mix (mit N ₂ und O ₂) und Wasserstoff, Quenchgas: Stickstoff 5.0
Temperatur	Injektor: 120°C Säule: 40°C Detektor: 120°C
Methanisator	Eigenbau
Säule	NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande), 20 cm Edelstahlsäule, Ø 1/8''
Temperatur	350°C
Nachweisgrenze	Methan: 1 ppm _v

4.4.2 Messung von Wasserstoff

Zur Bestimmung von Wasserstoff $<100 \text{ ppm}_v$ wurde ein Gaschromatograph mit Reduktivgasdetektor (Tabelle 7; RGD2, Trace Analytical, Techmaton Vertriebsgesellschaft für Umweltanalytik, Düsseldorf) verwendet. Die Eichung wurde als 1-Punkt-Eichung mit einer $100 \mu\text{l}$ Pressure-Lock-Spritze (VICI, Baton Rouge LA, USA) durchgeführt. Als Eichgas diente ein Gasgemisch aus 2 ppm_v Wasserstoff in Stickstoff.

Tabelle 7: Geräteparameter des RGD2-Gaschromatographen.

Säule	1,4 m Edelstahlsäule, $\varnothing 1/2''$, Trägermaterial: Molsieb 5 \AA 80/100 mesh
Trägergas	Synthetische Luft
Detektor	HgO-Konversions-Detektor
Temperatur	Säule: 85°C , Detektor: 90°C
Nachweisgrenze	1 ppm_v

4.5 Messung radioaktiver Isotope

4.5.1 Szintillationsmessung

Zur Überprüfung der in II.7.1.3 eingesetzten radioaktiven $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Acetat}$ -Stammlösung wurde diese nach ihrer Verdünnung in einem Szintillationsmessgerät Beckmann LS 6500 (München) analysiert. Zu $100 \mu\text{l}$ der Stammlösung wurden 15 ml Quickzint 501 (Zinsser, Frankfurt) gegeben und diese Mischung im Szintillationszähler gemessen.

4.5.2 Analyse von $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ (RAGA)

Für die Messung von $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ wurde ein GC-System (Shimadzu GC-8A) mit einem Radioaktivitäts-Gas-Detektor (RAGA) verwendet. Der RAGA war so hinter dem Methanisator angeschlossen, dass der Gasstrom parallel im FID und im RAGA analysiert werden konnte (Tabelle 8). Die Auswertung erfolgte über das Messprogramm GINA der Firma Nuclear Interface. Geeicht wurde mit einem $[^{14}\text{C}]\text{-Bicarbonat}$ standard. Dazu wurden aus einer $[^{14}\text{C}]\text{-Bicarbonat}$ stammlösung $100 \mu\text{l}$ in eine ausgeliterte mit 10 ml H_2O befüllte 120-ml Serumflasche gefüllt, die zuvor mit Stickstoff gespült und dann verschlossen worden war. Durch Zugabe von 1 ml H_2SO_4 (1M) wurde das gelöste Bicarbonat in gasförmiges Kohlendioxid umgewandelt. Dieses konnte anschließend mit Hilfe des RAGA

analysiert werden. Der [^{14}C]-Bicarbonatstandard wurde zusätzlich im Szintillationszähler gegengeeicht.

Tabelle 8: Geräteparameter des Gaschromatographen-Systems (GC-8A mit FID und RAGA).

Säule	2 m Edelstahlsäule, \varnothing 1/8'', Trägermaterial: Poropack QS 50/100 mesh
Trägergas	Wasserstoff 5.0
Quenchgas	Methan
Detektoren	FID, Brenngase: H_2 und synthetische Luft RAGA (Typ IM 2026/2028 der Firma Raytest, Straubenhardt) Zählrohr: Durchflusszählrohr, 10 ml Volumen
Temperatur	Säule: 40°C
Nachweisgrenze	ca. 1500 dpm ml^{-1}
Methanisator	Eigenbau
Säule	NiCr-Ni-katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande) 20 cm Edelstahlsäule, \varnothing 1/8''
Temperatur	350°C

4.6 Messung stabiler Isotope

4.6.1 Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid

Die Messung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid wurde an einem Gaschromatographen mit integriertem Verbrennungs-Isotopenverhältnismassenspektrometer (GC-C-IRMS) (Thermoquest, Finnigan, Bremen) durchgeführt. Die Analysen erfolgten nach der Methode von Brand (1996). Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe des Data Systems ISODATTM (Finnigan, Bremen). Das ermittelte Isotopenverhältnis wurde als $\delta^{13}\text{C}$ -Wert und als Atomprozent [atm %] in folgender Schreibweise dargestellt:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right] \times 10^3 \quad [1]$$

$$\text{atm \%} = \frac{100 R_{\text{Standard}} \left[\frac{\delta_{\text{Probe}}}{1000 + 1} \right]}{1 + R_{\text{Standard}} \left[\frac{\delta_{\text{Probe}}}{1000 + 1} \right]} \quad [2]$$

$\delta^{13}\text{C}$: stabiles Kohlenstoffisotopenverhältnis relativ zum internationalen Standard [‰]

R : Verhältnis der Isotopenhäufigkeit der Probe bzw. des Standards ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)

atm %: Atomprozent [atm %]

Tabelle 9: Geräteparameter des GC-C-IRMS.

GC	Hewlett Packard 6890 (Waldborn)
Injektor	Splitt/Splittless
Säule	Pora PLOT Q, Länge: 27 m, Ø 0,32 mm, Schichtdicke: 10 µm
Probenvolumen	10-100 µl
Splitt: Fluss	10:1
Fluss	2,6 ml min ⁻¹
Temperatur	Injektor: 150°C Ofen: 25°C
Trärgas	Helium 4.6
GC-C Interface	Standard GC Combustion Interface III Oxidations-Reaktor: 940°C Reduktions-Reaktor: 650°C
IRMS	Finnigan MAT delta plus (Bremen)
Eichstandard	CO ₂ 4.8 (Reinheitsgrad 99.998 %, Messer-Griessheim, Düsseldorf, Germany) interkalibriert gegen NBS 22 und USGS 24 vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena

4.6.2 Analyse der ¹³C/¹²C-Isotopensignatur von Fettsäuren

Die Messung der ¹³C/¹²C-Isotopensignatur von Fettsäuren wurde an einem HPLC-System mit gekoppeltem IRMS nach der Methode von Krummen et al. (2004) durchgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte wie unter II.4.6.1 beschrieben.

Tabelle 10: Geräteparameter des HPLC-IRMS.

Pumpe	Spectra System P1000, Thermo Finnigan, San Jose, Ca, USA
Säule	Aminex HPX-87-H, BioRad Laboratories, München
Säulenofen	Mistral, Spark, (Emmen, Niederlande)
Eluent	100 mM KH ₂ PO ₄ , pH 5 mit Helium begast
Flussrate	300 µl min ⁻¹
Temperatur	35°C
Interface	Finnigan LC IsoLink (Thermo Electron Corporation, Bremen, Deutschland)
Temperatur	99,9°C
IRMS	Finnigan MAT delta plus (Bremen)
Eichstandard	CO ₂ 4.8 (Reinheitsgrad 99.998 %, Messer-Griessheim, Düsseldorf, Deutschland) interkalibriert gegen NBS 22 und USGS 24 vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Jena

4.7 Berechnungen

4.7.1 Methan- und Kohlendioxidkonzentration in Sedimentaufschlämmungen

Zur Berechnung der freigesetzten Methan- und Kohlendioxidmengen wurden die gemessenen Konzentrationen [ppm_v] in die Stoffmenge n [μmol] umgerechnet und entweder auf das Volumen der Sedimentaufschlämmung oder auf die eingesetzte Menge unverdünnten Sediments bezogen.

$$F_x = \frac{M_v * p * (V_g + V_w * \alpha)}{R * T * V_w} \quad [3]$$

F_x : CH₄- bzw. CO₂-Konzentration [μmol cm⁻³]

M_v : Mischungsverhältnis CH₄ bzw. CO₂ [ppm_v]

p : Druck [bar]

V_g : Volumen der Gasphase [l]

V_w : Volumen der wässrigen Phase [cm⁻³]

α : Bunsenkoeffizient (CH₄: $\alpha_{15^\circ\text{C}}=0,04047$; $\alpha_{30^\circ\text{C}}=0,029$;

CO₂: $\alpha_{15^\circ\text{C}}=1,071$; $\alpha_{30^\circ\text{C}}=0,6678$)

R : allgemeine Gaskonstante (0,083144 [l bar K⁻¹ mol⁻¹])

T : Temperatur [K]

4.7.2 Ratenberechnung der Methan- und Kohlendioxidproduktion in Sedimentaufschlämmungen

Zur Berechnung der Methan- und Kohlendioxidproduktionsraten wurden zunächst wie unter II.4.7.1 beschrieben die Methan- bzw. Kohlendioxidkonzentrationen berechnet. Diese wurden anschließend als Funktion der Zeit dargestellt. Aus der Steigung der Konzentration im linearen Bereich konnte dann die Methan- bzw. Kohlendioxidproduktionsrate berechnet werden.

$$R_x = \frac{\Delta F_x}{\Delta t} \quad [4]$$

R_x : CH₄ bzw. CO₂-Produktionsrate [μmol cm⁻³ d⁻¹]

F_x : CH₄ bzw. CO₂-Konzentration [μmol cm⁻³]

t : Zeit [d]

4.7.3 Partialdruck von Wasserstoff in Sedimentaufschlämmungen

Die in der Gasphase von Sedimentaufschlämmungen gemessenen Wasserstoffkonzentrationen [ppm_v] wurden mit folgender Formel in den jeweiligen Partialdruck umgeformt:

$$p = \frac{M_v}{10} \quad [5]$$

M_v : Mischungsverhältnis H₂ [bar] (1 ppm_v = 1×10⁻⁶ bar = 0,1 Pa)

p : Druck [Pa] (1 bar = 10⁵ Pa)

4.7.4 Berechnung des respiratorischen Index für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat

Der respiratorische Index (RI) für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat wurde mit folgender Formel berechnet:

$$RI = \frac{{}^{14}CO_2}{{}^{14}CO_2 + {}^{14}CH_4} \quad [6]$$

RI: respiratorischer Index

Die Konzentrationen von ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ werden in dpm angegeben.

4.7.5 Berechnung der gebildeten ¹³CH₄- und ¹³CO₂-Mengen für die Umsetzung von [2-¹³C]-Acetat

Die Berechnung der gebildeten ¹³CH₄- und ¹³CO₂-Mengen [μmol cm⁻³] aus [2-¹³C]-Acetat erfolgte mit Hilfe der am GC-IRMS (s. II.4.6.1) ermittelten ¹³C-Atomprozent und der am GC-FID (s. II.4.4.1) ermittelten Gesamtproduktion von Methan und Kohlendioxid, die wie unter II.4.7.1 beschrieben berechnet wurde.

$$[{}^{13}C]-F_x = \frac{F_x}{100} \times \text{atm \%} \quad [7]$$

F_x : CH₄- bzw. CO₂-Konzentration [μmol cm⁻³]

[¹³C]- F_x : ¹³CH₄- bzw. ¹³CO₂-Konzentration [μmol cm⁻³]

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Sedimentproben und Kulturen

Die Extraktion von Nukleinsäuren wurde nach dem Extraktionsprotokoll von Noll et al. (2005) mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. Für die Extraktion von DNA wurden Lösungen und Puffer mit einem pH-Wert zwischen 7 und 8 verwendet (s. II.5.1.1). Eine selektivere Isolierung von RNA gegenüber DNA wurde aufgrund der Verwendung saurer Lösungen und Puffer (pH 5) ermöglicht.

5.1.1 Lösungen und Puffer zur Extraktion von Nukleinsäuren

DEPC-Wasser

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	0,1 % [v/v]
----------------------------	-------------

Die Herstellung des DEPC-Wassers erfolgte in für 6 h bei 180°C sterilisierten Glasgefäßen. Zunächst wurde die Lösung für ca. 4 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend autoklaviert.

Alle unter II.5.1.1 aufgeführten Lösungen zur Extraktion von RNA wurden in DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Die Behandlung des Wassers mit DEPC sorgte für eine Inaktivierung vorhandener RNasen.

10 % SDS-Lösung

SDS	10 % [w/v]
NaCl	0,1 M

TPM-Puffer (Felske et al., 1996)

Tris-HCl, pH 7	50 mM
Polyvinylpyrrolidon K25	1,7 % [w/v]
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	20 mM

Phenol gesättigter Lysispuffer (Noll et al., 2005)

Tris-HCl	5 mM
Na ₂ EDTA	5 mM
SDS	0,1 % [w/v]
wassergesättigtes Phenol, pH 5 (für RNA)	6 % [v/v]
bzw. Phenol, TE gesättigt, pH 8 (für DNA)	(nach dem Autoklavieren zugegeben)

Phenol, wassergesättigt, pH 5

für Extraktion von RNA

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

25:24:1 [v/v/v], wassergesättigtes Phenol, pH 5

für Extraktion von RNA

Phenol, TE gesättigt, pH 8

für Extraktion von DNA

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

25:24:1 [v/v/v], gesättigt mit 100 mM TRIS, pH 8

für Extraktion von DNA

Chloroform/Isoamylalkohol

24:1 [v/v]

5.1.2 Extraktion von Nukleinsäuren

Für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Kulturen wurden zunächst 20 ml der Kultur in 30-ml Schraubdeckelgefäßen bei 4°C und 10000 g für 15 min in einer Ultrazentrifuge (Sorvall RC 5B Plus, Rotor SS34) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl vorgekühltem TPM-Puffer resuspendiert und in 2-ml Schraubdeckelgefäße zu 0,5 g Zirkoniumbeads (Zirkonia Silica Beads, 0,1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma, USA) pipettiert. Für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Sedimentproben wurde zunächst 1 g Glasperlen (Ø 0,17-0,18 mm, B. Braun Biotech International, Melsungen) in 2-ml Schraubdeckelgefäße eingewogen. Anschließend wurden 0,5 ml der Sedimentprobe und 500 µl des vorgekühlten TPM-Puffers dazu pipettiert. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Bead Beater (Bio101 Mini Bead Beater; Savant; New York; USA) für 45 s bei $6,5 \text{ m s}^{-1}$. Durch anschließende Zentrifugation bei 20000 g und 4°C für 5 min wurden die Glasperlen und Zelltrümmer pelletiert. Der wässrige Überstand wurde zu 700 µl vorgekühltem Phenol in ein neues 2-ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Pellet wurde nach Zugabe von 600 µl kaltem phenolhaltigem Lysis-Puffer erneut im Bead Beater (Bio101 Mini Bead Beater; Savant; New York; USA) für 45 s bei $6,5 \text{ m s}^{-1}$ einem Zellaufschluss unterzogen und wie zuvor zentrifugiert. Der

wässrige Überstand wurde dann mit dem Überstand des ersten Zellaufschlusses und dem Phenol vereinigt, für 1 min ausgeschüttelt und 5 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Dieser wässrige Überstand wurde anschließend 1 min mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) ausgeschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend folgte eine Ausschüttlung des Überstandes mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 [v/v]) in 2-ml Phase Lock GelTM Heavy Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg), um das restliche Phenol aus der wässrigen Phase zu entfernen. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 96 %igem Ethanol über Nacht bei –20°C. Durch Zentrifugation bei 4°C und 20000 g für 45 min wurden die Nukleinsäuren pelletiert. Die Pellets wurden zusätzlich mit 500 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4°C und 20000 g für 10 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl PCR-Wasser (Sigma) resuspendiert und bei –80°C gelagert.

5.2 DNase Verdau

Für RNA-gestützte Analysen wurde die coextrahierte DNA mit Hilfe einer DNase aus dem Nukleinsäureextrakt entfernt. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 60 µl durchgeführt. Hierfür wurden 40 µl des Nukleinsäureextrakts mit 5 µl (1 U µl⁻¹) RQ1 RNase-freier DNase (Promega), 6 µl des 10× DNase-Puffers (Promega), 3 µl (40 U µl⁻¹) RNaseOut (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen) und 6 µl RNase freiem Wasser für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die RNase zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend mit DEPC-Wasser auf 600 µl aufgefüllt und eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1 [v/v/v]), sowie eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24:1 [v/v]) durchgeführt. Nach erneuter Fällung der Nukleinsäure (s. II.5.1) wurde das Pellet mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und in 40 µl RNase freiem PCR-Wasser (Sigma) gelöst. Der vollständige Verdau der DNA wurde neben der Agarosegelelektrophorese zusätzlich durch eine PCR überprüft (s. II.5.6.2).

5.3 Agarosegelelektrophorese

5.3.1 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Eurobio, Les Ulis Cedex B, Frankreich)

Tris-HCl, pH 8	40 mM
Natriumacetat	10 mM
EDTA	1 mM

Auftragspuffer 6× (Sigma)

Saccharose	50 % [w/v]
Bromphenolblau	0,1 % [w/v]
Harnstoff	4,00 M
EDTA	50,00 mM

Smart-Ladder (DNA-Längenstandard) (Eurogentec, Seraing, Belgien)

5.3.2 Analyse von Nukleinsäure mittels Agarosegelelektrophorese

Aliquots extrahierter RNA und DNA, so wie erzeugter PCR-Amplifikate wurden zur Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration bzw. der Fragmentlänge auf ein 1,5 %iges [w/v] 1× TAE-Agarosegel aufgetragen. Jede Probe wurde vor dem Auftragen mit 0,3 Volumen Auftragspuffer gemischt. Als Längen- und Mengenstandard wurde der Smart-Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1× TAE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer bei 120 V und einer Laufzeit von ca. 45 min. Das Gel wurde anschließend in einer 0,001 %igen [v/v] Ethidiumbromidlösung gefärbt und mit einer Videokamera (INTAS, Gel Jet Imager, Göttingen) aufgenommen.

5.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

5.4.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Biophotometer

Die Quantifizierung der aufgereinigten RNA- und DNA-Extrakte, so wie der PCR-Amplifikate erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg). Hierfür wurden 2 µl der Nukleinsäure-Lösung mit 68 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und deren Absorption gemessen. Die

Konzentration doppelsträngiger DNA bzw. einzelsträngiger RNA ergibt sich aus folgenden Formeln (Sambrook et al., 1989):

$$\text{DNA: } c = 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260\text{nm}} \quad [8]$$

$$\text{RNA: } c = 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260\text{nm}} \quad [9]$$

c : Konzentration doppelsträngiger DNA bzw. einzelsträngiger RNA [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$]

$A_{260\text{ nm}}$: Absorption bei 260 nm

5.4.2 Quantifizierung von RNA mittels RiboGreen

Die Quantifizierung von RNA-Extrakten erfolgte zusätzlich durch Fluoreszenzmessung an einem Fluorimeter (SAFIRE, Fa. TECAN, Crailsheim) und der XFluor4 Software mit dem RiboGreen RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Für jede Messung wurde eine Verdünnungsreihe mit dem quantitativen RNA-Standard des Kits (16S und 23S rRNA von *E. coli*; $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) von 0 bis $100 \text{ ng rRNA } \mu\text{l}^{-1}$ (Quantifizierung von RNA in Extrakten aus Umweltproben) bzw. 0 bis $20 \text{ ng rRNA } \mu\text{l}^{-1}$ (Quantifizierung von RNA in Gradienten-Fraktionen) hergestellt. $10 \mu\text{l}$ jeder Verdünnungsstufe wurden in eine Reihe einer 96 Well-Mikrotiterplatte (Brandt, Deutschland) pipettiert. In die folgenden Reihen wurden je $10 \mu\text{l}$ verschiedener Verdünnungen der unbekannten Proben pipettiert. Nach Zugabe von $90 \mu\text{l}$ einer 1:360 verdünnten RiboGreen Lösung in jedes Well erfolgte die Messung (Einstellungen: Anregung: 470 nm, Emission: 516 nm, Bandweite jeweils 12,5). Die Fluoreszenzdaten des quantitativen RNA-Standards (Verdünnungsreihe, siehe oben) und der ausgewählten unbekannten RNA-Extrakte wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel Version 7.0 (Microsoft, Berlin) exportiert. Die Fluoreszenzwerte des RNA-Mengenstandards wurden gegen ihre Menge [ng] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Mittels der resultierenden Geradengleichung konnte aus den Fluoreszenzwerten der RNA-Extrakte die Konzentration der RNA [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$] bestimmt werden.

5.5 Selektive Isolierung von Nukleinsäuren mittels Stable-Isotope-Probing

5.5.1 Lösungen und Puffer für die Herstellung von CsTFA-Gradienten

CsTFA (Cäsiumtrifluoroacetat) (Amersham) 2 g ml⁻¹

Formamid (Amersham)

Gradienten-Puffer

Tris-HCl, pH 8 100 mM

KCl 100 mM

Na₂EDTA 1 mM

Der Gradienten-Puffer wurde mit DEPC-Wasser (s. II.5.1.1) angesetzt.

5.5.2 Herstellung von CsTFA-Gradienten

Die selektive Isolierung leichter, nicht-markierter und schwerer, ¹³C-markierter RNA erfolgte mit Hilfe der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation mit einem CsTFA enthaltenden Gradientenmedium (Lueders et al., 2004c). Hierfür wurden zunächst 4,5 ml CsTFA (ca. 2 g ml⁻¹, Amersham) mit 175 µl Formamid gemischt. Anschließend wurde eine 500 ng entsprechende Menge rRNA-Extrakt (Quantifizierung mit RiboGreen, s. II.5.4.2), die mit Gradientenpuffer auf ein Volumen von 1 ml gebracht worden war, zugegeben. Nach guter Durchmischung erfolgte die Bestimmung des Brechungsindex eines 75 µl Aliquots aufgrund dessen die Dichte des Gemisches (Gradientenmediums) berechnet werden konnte (s. II.5.5.4, Gleichung 10). Der bei der Geräteeinstellung nD-TC gemessene Brechungsindex des Gradientenmediums sollte bei 1,3725 ± 0,0002 liegen. Dies entspricht einer CsTFA-Konzentration von etwa 1,79 g ml⁻¹, wodurch eine Dichte des Gradientenmediums vorliegt, bei der eine optimale Auftrennung von RNA erreicht werden kann. Das Gemisch wurde anschließend mit einer Spritze in ein 6-ml polyallomer UltraCrimp Gefäß (Sorvall, Kendro Laboratory Products, USA) überführt und verschlossen. Die Zentrifugation erfolgte in einem TV865 vertikal Rotor für 65 h, bei 20°C und 39 krpm (130000 g).

5.5.3 Gradientenfractionierung

Die Fraktionierung der Gradienten erfolgt mit Hilfe einer S1000 HPLC-Pumpe (Sykam) (s. I.4, Abbildung 5). Hierfür wurde eine sterile Kanüle (Ø: 0,4 mm) über einen Schlauch an die Pumpe und ein mit DEPC-Wasser gefülltes Gefäß angeschlossen. Die Kanüle wurde dann waagrecht am oberen Ende des Zentrifugationsgefäßes eingestochen und auf der gegenüberliegenden Seite innen in der Gefäßwand fixiert. Mit einer zweiten Kanüle wurde am Boden des Gefäßes ein Loch eingestochen, unter dem dann die jeweiligen 2-ml Reaktionsgefäße zum Sammeln der Fraktionen platziert wurden. Die Pumpe wurde auf einen Fluss von $0,75 \text{ ml min}^{-1}$ eingestellt, wodurch das Gradientenmedium von oben her durch DEPC-Wasser ersetzt wurde und 16 Fraktionen ($375 \text{ } \mu\text{l}$) aus einem Gradienten gesammelt werden konnten.

5.5.4 Bestimmung der Gradientendichte mittels Brechungsindex

Die Bestimmung des Brechungsindex erfolgte von jeweils $75 \text{ } \mu\text{l}$ Aliquots des Gradientenmediums vor der Zentrifugation (s. II.5.5.1) und der einzelnen Fraktionen nach der Zentrifugation mit einem Refraktometer der Firma Leica im Modus nD-TC. Nach der Dichtezentrifugation erfolgte die Messung von der Fraktion mit der geringsten Dichte („leicht“, nicht-markierte RNA) zur Fraktion mit der größten Dichte („schwer“, ^{13}C -markierte RNA). Zur Berechnung der Dichte der Fraktionen wurde eine Eichgerade der Brechungsindexe des in wechselnden Anteilen kombinierten Gradientenmediums ermittelt. Mit folgender Formel konnte dann die Dichte der unbekannten Proben anhand ihres Brechungsindexes berechnet werden:

$$\rho = 384,44060x^2 - 1031,00836x + 692,65494 \quad [10]$$

x : Brechungsindex (nD-TC) eines $75 \text{ } \mu\text{l}$ Aliquots

ρ : Dichte [g ml^{-1}]

5.5.5 Fällung von RNA aus Gradientenfraktionen

Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von $500 \text{ } \mu\text{l}$ Isopropanol in jede Fraktion. Nach guter Durchmischung wurde die RNA durch Zentrifugation bei 4°C und 20000 g gefällt. Das Pellet wurde mit $150 \text{ } \mu\text{l}$ 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei

20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, das Pellet in 30 µl PCR-Wasser (Sigma) eluiert und durch Schütteln für 1 min bei 30°C und 1400 rpm in einem Eppendorf Thermomixer gelöst.

5.6 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische Vermehrung von definierten Genfragmenten (hier: 16S rRNA-Gen als phylogenetisches Markergen) aus Nukleinsäureextrakten. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entweder für T-RFLP- und Sequenzanalysen (s. II.5.7 und II.5.8.3) verwendet oder die PCR-Methode selbst wurde zur Quantifizierung von Zielmolekülen (= Anzahl von 16S rRNA-Gen-Kopien bzw. Anzahl von 16S rRNA-Molekülen) benutzt („real-time“-PCR bzw. „real-time“-RT-PCR, II.5.6.3 und II.5.6.4). Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgeführt. Für die Primersequenzen gelten die nach IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) international gültigen Buchstaben um Positionen anzuzeigen, an denen verschiedene Nukleotidreste eingebaut wurden („Wobble“-Positionen): M: A/C; R: A/G; W: A/T; S: G/C; Y: C/T; K: G/T; V: A/G/C; H: A/C/T; D: A/G/T; B: G/C/T. Alle Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (München) bezogen.

Nach der PCR wurden Aliquots der erhaltenen Amplifikate durch Agarose-gelelektrophorese (s. II.5.2) überprüft. Zur Entfernung von Nukleotiden, Enzymen, Salzen und nicht gebundenen Primern wurden die PCR-Produkte mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und in 15 µl EB-Puffer eluiert.

II. Material und Methoden

Tabelle 11: Bezeichnung (Bez.), Sequenz, Zielgruppe, Verwendung und Quelle der benutzten Oligonukleotid-Primer.

Bez.	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Zielgruppe	Verwendung ^a	Quelle
Ba9/27f*	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	<i>Bacteria</i>	T-RFLP, qPCR, Klon	(Lane, 1991)
Ba519f	CAG CMG CCG CGG TAA NWC	<i>Bacteria</i>	qPCR	(Lane, 1991)
Ba907b	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	<i>Bacteria</i>	T-RFLP	(Lane, 1991)
Ba1492b	ACG GYT ACC TTG TTG TTA CGA CTT	<i>Bacteria</i>	Klon	(Weisburg et al., 1991)
Ar7f	TTC YGG TTG ATC CYG CC	<i>Archaea</i>	Klon	(Lueders et al., 2004a)
Ar109f	ACK GCT CAG TAA CAC GT	<i>Archaea</i>	T-RFLP, qPCR, Klon	(Großkopf et al., 1998)
Ar912rt*	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA	<i>Archaea</i>	T-RFLP, qPCR, Klon	(Lueders und Friedrich, 2002)
Ar1384r	CGG TGT GTG CAA GGA GCA	<i>Archaea</i>	Klon	(Lueders et al., 2004a)
M13f	GTT TTC CCA GTC ACG AC	Insert	Klon	TOPO-TA-Cloning®-Kit
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Insert	Klon, Seq	TOPO-TA-Cloning®-Kit
T7f	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Insert	Klon, Seq	TOPO-TA-Cloning®-Kit

^a Quantitative PCR bzw. quantitative RT-PCR (qPCR) (hier: „real-time“); T-RFLP-Analyse (T-RFLP), Sequenzierung (Seq) der partiellen 16S rRNA-Gene; PCR-Amplifikation für Klonierung und für Amplifikation des Vektorinserts von Klonen (Klon). TOPO (TOPO-TA-Cloning®-Kit, Invitrogen, de Schelp, Niederlande).

* Die mit einem Stern gekennzeichneten Primer wurden 5'-terminal FAM-markiert in die T-RFLP-Analyse eingesetzt.

5.6.1 PCR-Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene aus Umweltproben und Klonierungsvektoren

Die PCR-Reaktion für die Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene aus DNA-Extrakten von Sedimentproben und Klonierungsvektoren wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt (Tabelle 12). Als Negativkontrolle wurde in jeder PCR ein Ansatz mit sterilem PCR-H₂O ohne Zielmolekül mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten DNA-Extrakte der in Tabelle 2 aufgeführten Referenzorganismen. Alle DNA-Amplifikationen wurden in einem PCR-Gerät der Firma MWG durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgeführt, die PCR-Bedingungen zur Amplifikation sind in Tabelle 13 dargestellt. Die PCR-Reaktion wurde mit einem „Hot-

II. Material und Methoden

Start“ begonnen, indem die Proben so lange auf Eis gelagert wurden bis das PCR-Gerät 94°C erreicht hatte und sie erst dann in den Thermoblock eingesetzt wurden.

Tabelle 12: Verwendete Lösungen und eingesetzte Endkonzentrationen für 50 µl PCR-Ansatz.

Lösung	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
10× PCR-Puffer	10 mM Tris, pH 8,3; 50 mM KCl	1 mM Tris, pH 8,3; 5 mM KCl
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
BSA	20 µg µl ⁻¹	400 ng µl ⁻¹
dNTPs	jeweils 2 mM	jeweils 100 µM
Vorwärts-Primer	25 µM ^a , 33 µM ^b	0,25 µM ^a ; 0,33 µM ^b
Rückwärts-Primer	25 µM ^a , 33 µM ^b	0,25 µM ^a ; 0,33 µM ^b
Taq Polymerase	1 U µl ⁻¹	0,25 U µl ⁻¹
DNA		max. 100 ng
H ₂ O (DNase frei)		ad 50 µl

^a Primerkonzentration in 16S rRNA-Gen-PCR.

^b Primerkonzentration für Amplifikation des Inserts aus dem Vektor.

Tabelle 13: PCR-Bedingungen zur Amplifikation bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene aus Umweltproben und Klonierungsvektoren.

Primerkombination	Zielgruppe	A _t [°C]	iD _d [min]	D _d [s]	A _d [s]	E _d [s]	aE _d [min]	Zyklus- anzahl
Ba9/27f* / Ba1492b	<i>Bacteria</i>	52	3	45	45	80	5	25-30
Ar109f / Ar912rt*	<i>Archaea</i>	52	3	45	45	80	5	25-30
M13f / M13r	Vektorinsert	55	3	45	45	80	5	20-25

Primer-Anlagerungstemperatur (Annealing = A_t); Dauer der initialen Denaturierungsphase bei 94°C (iD_d); Dauer der Denaturierung bei 94°C (D_d); Dauer der Primeranlagerung (A_d); Dauer der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung bei 72°C (Elongation = E_d); Dauer der abschließenden DNA-Synthese (aE_d).

* Die mit einem Stern gekennzeichneten Primer wurden 5'-terminal FAM-markiert in die T-RFLP-Analyse eingesetzt.

5.6.2 RT-PCR bakterieller und archaeeller 16S rRNA aus Umweltproben

Die reverse Transkription (RT) von 16S rRNA aus RNA-Extrakten von Sedimentproben und Gradientenfraktionen und die anschließende Amplifikation der „ribosomalen 16S copy DNA“ (16S rcDNA) wurden mit dem „One-step“ Access Quick1 RT-PCR-System von Promega durchgeführt (s. Tabelle 14 und 15). In jeder RT-PCR wurde als Negativkontrolle ein Ansatz mit sterilem PCR-H₂O ohne Zielmolekül mitgeführt. Für die Kontrolle des vollständigen DNase-Verdaus wurde zusätzlich für jede Probe eine Kontrollreaktion ohne die Zugabe der reversen Transkriptase angesetzt. Als Positivkontrollen dienten RNA-Extrakte der in Tabelle 2 aufgeführten Referenzorganismen.

Tabelle 14: Verwendete Lösungen und Endkonzentrationen für 50 µl RT-PCR-Ansatz.

Lösung	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
2× AccessQuick Master Mix	3 mM MgSO ₄ ; X µM dNTPs ^a ; X U µl ⁻¹ Tfl DNA Polymerase ^a	1,5 mM MgSO ₄
BSA	20 µg µl ⁻¹	400 ng µl ⁻¹
Vorwärts-Primer	25 µM	0,5 µM
Rückwärts-Primer	25 µM	0,5 µM
AMV Reverse Transkriptase	5 U µl ⁻¹	0,1 U µl ⁻¹
RNA		max. 100 ng
H ₂ O (RNase frei)		ad 50 µl

^a Keine Angaben des Herstellers.

Tabelle 15: RT-PCR-Bedingungen zur reversen Transkription bakterieller und archaeeller 16S rRNA aus Umweltproben mit anschließender Amplifikation der erhaltenen 16S rcDNA („One-Step“-Reaktion).

Primerkombination	Zielgruppe	RT _t [°C]	RT _d [min]	A _t [°C]	iD _d [min]	D _d [s]	A _d [s]	E _d [min]	aE _d [min]	Zyklen- anzahl
Ba9/27f* / Ba907b	<i>Bacteria</i>	48	30	52	2	30	45	1	7	18-22
Ar109f / Ar912rt*	<i>Archaea</i>	48	30	52	2	30	45	1	7	18-22

Temperatur der reversen Transkription (RT_t); Dauer der reversen Transkription (RT_d); Primer-Anlagerungstemperatur (Annealing = A_t); Dauer der initialen Denaturierungsphase bei 94°C (iD_d); Dauer der Denaturierung bei 94°C (D_d); Dauer der Primeranlagerung (A_d); Dauer der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung bei 72°C (Elongation = E_d); Dauer der abschließenden DNA-Synthese bei 72°C (aE_d).

* Die mit einem Stern gekennzeichneten Primer wurden 5'-terminal FAM-markiert in die T-RFLP-Analyse eingesetzt.

5.6.3 Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene mittels „real-time“-PCR

Die Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene in DNA-Extrakten aus Sedimentproben erfolgte mit Hilfe der „real-time“-PCR-Methode (Suzuki et al., 2000; Raeymaekers, 2000).

Für die Eichung der „real-time“-PCR-Assays zur Quantifizierung bakterieller 16S rRNA-Gene wurde chromosomale DNA von *Escherichia coli* (Roche Diagnostics) eingesetzt. Die Anzahl an Zielmolekülen (16S rRNA-Gen) in diesem DNA-Extrakt wurde über die Genomgröße in Basenpaaren und die Anzahl der 16S rRNA-Gen-Operons berechnet (Fogel et al., 1999). Die Eichung der „real-time“-PCR-Assays zur Quantifizierung archaeeller 16S rRNA-Gene wurde mit 16S rRNA-Gen-PCR-Produkten von *Methanosarcina barkeri* durchgeführt. Dieser Standard wurde freundlicherweise von Melanie Klose (Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung des archaeellen Standards wurden mit dem Primerpaar Ar7f/ Ar1384r (*Archaea*-spezifisch) PCR-Produkte aus einer Referenz-DNA-Lösung amplifiziert. Nach Aufreinigung mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben (DNA wurde in 40 µl TE eluiert), wurde 1 µl des PCR Produktes mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) kloniert (s. II.5.8.1). Nach Durchführung einer vektorspezifischen PCR wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. II.5.8.3). Diese DNA-Lösung wurde mit dem PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer Microtiterplatte (Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden) in einem Fluorimeter (Tekan) gemessen (Durchführung wie Quantifizierung mittels RiboGreen, s. II.5.4.2). Die Fluoreszenzdaten des quantitativen λ-Phagen-DNA-Mengenstandards des Kits (Verdünnungsreihe) und des ausgewählten M13-PCR-Produktes wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel Version 7.0 (Microsoft, Berlin) exportiert. Die Fluoreszenzwerte des λ-Phagen-DNA-Mengenstandards des Kits wurden gegen ihre Menge [ng] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Mittels der resultierenden Geradengleichung konnte aus den Fluoreszenzwerten des M13-PCR-Produktes die Konzentration der DNA [ng µl⁻¹] bestimmt werden. Dieser Wert konnte dann mit Hilfe folgender Formel in die Anzahl an Zielmolekülen umgerechnet werden:

$$c_S = \frac{c_W}{N \times M_N} \times N_A \quad [11]$$

c_S : Konzentration der amplifizierbaren Zielmoleküle [Zielmolekül-Anzahl μl^{-1}]

c_W : Konzentration [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$]

N : Länge des Standards in Basenpaaren

M_N : molare Masse eines Basenpaars ($649,5 \text{ ng nmol}^{-1}$; Mittelwert der Basenpaarungen
A = T und G \equiv C)

N_A : Avogadrokonstante ($6,022 \times 10^{23} \times 10^{-9} \text{ nmol}^{-1}$)

Die „real-time“-PCR-Messung wurde mit dem SYBR Green Jumpstart™ *Taq* Ready Mix von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) durchgeführt. Für die Quantifizierung bakterieller 16S rRNA-Gen-Kopien wurde die Primerkombination Ba519f / Ba907b, für die Quantifizierung archaeeller 16S rRNA-Gen-Kopien die Primerkombination Ar109f / Ar912rt verwendet (s. Tabelle 11). Die PCR-Amplifikation wurde mit einem iCycler IQ Thermocycler in 96-Well-Mikrotiterplatten (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μl angesetzt (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Verwendete Lösungen und Endkonzentrationen für 25 μl „real-time“-PCR-Ansatz.

Lösung	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
SYBR Green Jumpstart™ <i>Taq</i> Ready Mix		12,25 μl
MgCl ₂	50 mM	4 mM
Vorwärts-Primer	30 μM	0,3 μM
Rückwärts-Primer	30 μM	0,3 μM
DNA		5 μl
Fluoreszein (FITC)	1 μM	10 pM
H ₂ O (DNase frei)		ad 25 μl

Zunächst wurden Verdünnungsreihen der DNA-Extrakte in die Messung eingesetzt, um die Verdünnungsstufe herauszufinden, ab der keine Hemmung der PCR-Amplifikation durch eventuell vorhandene Huminsäuren oder andere Hemmstoffe mehr zu beobachten war. Für die tatsächliche Quantifizierung wurden die DNA-Extrakte dann 1:100 verdünnt und davon je 5 μl in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Für die Eichung der „real-time“-PCR-Messung (d. h. in jeder Mikrotiterplatte) wurden jeweils 5 μl einer Verdünnungsreihe eines spezifischen, quantifizierten DNA-Standards mitgeführt (s. oben). Nach Zugabe von 20 μl des Reaktionsgemisches wurde die Platte mit einer selbstklebenden optischen Folie

(BioRad Laboratories, München) verschlossen. Um die Amplifikationskinetik während der PCR verfolgen zu können, enthielt das Reaktionsgemisch den DNA-Farbstoff SybrGreen I, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Mit fortschreitender Zyklenzahl und ansteigender Konzentration doppelsträngiger DNA steigt somit die Fluoreszenzintensität der Lösung. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurden die Daten während der DNA-Synthese-Phase dokumentiert. Um die Kameraeinstellung zu optimieren und eine Kalibrierung der Mikrotiterplatte durchführen zu können, enthielt das Reaktionsgemisch eine Fluoreszeinlösung (FITC = Calibrationdye), 1 mM; BioRad Laboratories, München). Alle unbekannten Proben und Standards wurden in drei Replikaten gemessen. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Das Temperaturprofil der PCR-Reaktionen wurde als Dreischritt-Protokoll durchgeführt. Anstelle des abschließenden DNA-Synthese-Schrittes erfolgte die Aufnahme einer Schmelzkurve der entstandenen PCR-Produkte zwischen 75°C auf 100°C, um zwischen spezifischen Amplikons und unspezifischen SybrGreen-Signalen, wie z. B. Primerdimeren, zu unterscheiden.

Aus der Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl wurde der Schwellenwertzyklus (= Threshold Cycle [C_T]) bestimmt. Dieser Wert ist definiert als die rationale Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit der iCycler IQ Optical System Software V 3.0a (BioRad Laboratories, München) durchgeführt. Da ein linearer Zusammenhang zwischen dem C_T einer Reaktion und dem Logarithmus der Anzahl an Zielmolekülen besteht, konnten die Daten mit Hilfe linearer Regression interpoliert werden. Mit der resultierenden Geradengleichung aus den C_T -Werten der Eichstandards (Verdünnungsreihe) wurde die Anzahl der Zielmoleküle in den DNA-Extrakten bestimmt.

Tabelle 17: PCR-Bedingungen zur Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gene in Umweltproben.

Primerkombination	Zielgruppe	A_t [°C]	iD_d [min]	D_d [s]	A_d [s]	E_d [s]	Zyklus- anzahl
519f / Ba907b	<i>Bacteria</i>	52	6	20	20	50	40
Ar109f / Ar912rt	<i>Archaea</i>	52	6	20	20	50	40

Primer-Anlagerungstemperatur (Annealing = A_t); Dauer der initialen Denaturierungsphase bei 94°C (iD_d); Dauer der Denaturierung bei 94°C (D_d); Dauer der Primeranlagerung (A_d); Dauer der DNA-Synthese bei 72°C (Elongation = E_d) während der zyklischen Wiederholung.

5.6.4 Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA mittels „real-time“-RT-PCR

Die Quantifizierung von 16S rRNA-Molekülen in RNA-Extrakten aus Gradientenfraktionen erfolgte mit Hilfe der an eine reverse Transkription gekoppelten „real-time“-PCR-Methode („real-time“-RT-PCR) (Lueders et al., 2004a).

Die Eichung der „real-time“-RT-PCR-Assays wurde mit 16S rRNA-Standards durchgeführt, die durch Transkription bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gen-Amplifikate hergestellt worden waren. Für die Herstellung dieser Standards wurden zunächst mit dem *Bacteria*-spezifischen Primerpaar Ba9/27f/Ba1492b von einer ausgewählten Klon-DNA (c5LKS17; *Syntrophus* sp.; s. Anhang A, Sequenzdaten zu III.1.3

Tabelle 32) und mit dem *Archaea*-spezifischen Primerpaar A9f/A1338b von *M. hungatei*-DNA PCR-Produkte derer 16S rRNA-Gene amplifiziert. Anschließend wurden 2 µl der PCR-Produkte mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning®-Kits (Invitrogen, de Schelp, Niederlande) und dem Klonierungsvektor pCR®2.1, der eine T7-Promotorsequenz besitzt, kloniert. Nach Durchführung einer vektorspezifischen M13-PCR (Gesamtvolumen 400 µl je Probe) mit dem Primerpaar M13f/M13r wurden die PCR-Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. II.5.2). Anschließend folgte eine Fällung der M13-PCR-Produkte mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 96 %igem Ethanol für 1 h bei –80°C (Durchführung der Fällung s. II.5.1), um eine Ankonzentration der PCR-Amplifikate zu erreichen. Hierfür wurden die erhaltenen Pellets nur noch in 35 µl EB-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Quantifizierung der PCR-Produkte mittels Biophotometer (s. II.5.4.1). Die RNA-Synthese wurde in einem PCR-Gerät der Firma MWG mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase (Promega, Mannheim) für 30 min und 37°C durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Verwendete Lösungen und Endkonzentrationen für Synthese der RNA-Standards.

Lösung	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
5× Transkriptionspuffer	200 mM Tris-HCl (pH 7,9), 30 mM MgCl ₂ , 10 mM Spermidin, 50 mM NaCl	20 µl
DTT	100 mM	10 mM
RNase OUT (Invitrogen)	40 U µl ⁻¹	100 U
rNTPs	100 mM	2,5 mM
T7-RNA-Polymerase	20 U µl ⁻¹	40 U µl ⁻¹
M13-PCR-Produkt		4 µg (in 100 µl Ansatz)
H ₂ O (DNase frei)		ad 100 µl

Anschließend folgte ein DNase-Verdau entsprechend den in II.5.2 beschriebenen Bedingungen. Die erhaltenen RNA-Lösungen wurden dann mit dem RiboGreen RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) auf einer Mikrotiterplatte (Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden) in einem Fluorimeter (Tekan) gemessen (Durchführung wie Quantifizierung mit RiboGreen, s. II.5.4.2). Die Fluoreszenzdaten des quantitativen RNA-Mengenstandards des Kits (Verdünnungsreihe) und der aus M13-PCR-Produkten synthetisierten RNA-Lösungen wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel Version 7.0 (Microsoft, Berlin) exportiert. Die Fluoreszenzwerte des RNA-Mengenstandards des RiboGreen Quantitation Kits wurden gegen ihre Menge [ng] aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Mittels der resultierenden Geradengleichung aus den Fluoreszenzwerten der RNA-Lösungen konnte die Konzentration der RNA [ng μl^{-1}] bestimmt werden. Dieser Wert konnte dann mit Hilfe folgender Formel in die Anzahl an Zielmolekülen umgerechnet werden:

$$c_S = \frac{c_W}{N \times M_N} \times N_A \quad [12]$$

c_S : Konzentration der amplifizierbaren Zielmoleküle [Zielmolekül-Anzahl μl^{-1}]

c_W : Konzentration [ng μl^{-1}]

N : Länge des RNA-Moleküls (in rNTPs)

M_N : molare Masse eines rNTPs (330 ng nmol^{-1} ; Mittelwert der rNTPs A, U, G und C)

N_A : Avogadrokonstante ($6,022 \times 10^{23} \times 10^{-9} \text{ nmol}^{-1}$)

Die „real-time“-RT-PCR-Messung wurde mit dem „One-Step“ AccessQuick1 RT-PCR-System von Promega durchgeführt. Für die Quantifizierung bakterieller 16S rRNA-Moleküle wurde die Primerkombination Ba519f / Ba907b, für die Quantifizierung archaeeller 16S rRNA-Moleküle die Primerkombination Ar109f / Ar912rt verwendet (s. Tabelle 11). Die RT-PCR-Amplifikation wurde mit einem iCycler IQ Thermocycler in 96-Well-Mikrotiterplatten (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 40 μl angesetzt (s. Tabelle 19).

II. Material und Methoden

Tabelle 19: Verwendete Lösungen und Endkonzentrationen für 40 µl „real-time“-RT-PCR-Ansatz.

Lösung	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
2× AccessQuick Master Mix	3 mM MgSO ₄ ; X µM dNTPs ^a ; X U µl ⁻¹ Tfl DNA Polymerase ^a	1,5 mM MgSO ₄
BSA	20 µg µl ⁻¹	200 ng µl ⁻¹
Vorwärts-Primer	25 µM	0,5 µM
Rückwärts-Primer	25 µM	0,5 µM
AMV Reverse Transkriptase	5 U µl ⁻¹	0,1 U µl ⁻¹
RNA		2 µl
SybrGreen I	Stammlösung (1:500)	2×
Fluoreszein (FITC)	1 µM	10 pM
H ₂ O (RNase frei)		ad 40 µl

^a keine Angaben des Herstellers.

Für die Messung wurden 2 µl RNA-Extrakt in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Zur Eichung der „real-time“-PCR-Messung (d. h. in jeder Mikrotiterplatte) wurden jeweils 2 µl einer Verdünnungsreihe eines spezifischen, quantifizierten RNA-Standards mitgeführt (s. oben). Nach Zugabe von 38 µl des Reaktionsgemisches wurde die Platte mit einer selbstklebenden optischen Folie (BioRad Laboratories, München) verschlossen. Um nach dem reversen Transkriptionsschritt die Amplifikationskinetik der PCR verfolgen zu können, enthielt das Reaktionsgemisch den DNA-Farbstoff SybrGreen I. Die weitere Dokumentation und Auswertung der Messung erfolgte wie unter II.5.6.3 beschrieben.

Tabelle 20: „Real-time“-RT-PCR-Bedingungen zur Quantifizierung bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Moleküle in Gradientenfraktionen.

Primerkombination	Zielgruppe	RT _i [°C]	RT _d [min]	A _i [°C]	iD _d [min]	D _d [s]	A _d [s]	E _d [min]	Zyklus- anzahl
Ba519f / Ba907b	<i>Bacteria</i>	48	30	52	3	30	30	1	40
Ar109f / Ar912rt	<i>Archaea</i>	48	30	52	3	30	30	1	40

Temperatur der reversen Transkription (RT_i); Dauer der reversen Transkription (RT_d); Primer-Anlagerungstemperatur (Annealing = A_i); Dauer der initialen Denaturierungsphase bei 94°C (iD_d); Dauer der Denaturierung bei 94°C (D_d); Dauer der Primeranlagerung (A_d); Dauer der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung bei 72°C (Elongation = E_d).

5.7 Terminale Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse

Mit Hilfe der terminalen Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Methode (T-RFLP) können genetische Fingerabdrücke („Fingerprints“) komplexer mikrobieller Gemeinschaften in Umweltproben gewonnen werden. Man erhält eine Auskunft über die Struktur der untersuchten mikrobiellen Gemeinschaft, d. h. über die Zusammensetzung sowie über die relative Häufigkeit des untersuchten Zielmoleküls in dieser Umweltprobe. Die T-RFLP-Methode lässt sich sowohl auf 16S rRNA-kodierende Gene (Liu et al., 1997; Chin et al., 1999) als auch direkt auf die 16S rRNA als Zielmolekül anwenden (Lueders und Friedrich, 2002). Für die Analyse aktiver mikrobieller Gemeinschaften hat sich gezeigt, dass 16S rRNA-gestützte Untersuchungen Veränderungen in der Struktur dieser Gemeinschaften sensitiver wiedergeben können als 16S rRNA-Gen-basierte Untersuchungen (Lueders und Friedrich, 2002).

Die T-RFLP-Methode beruht auf einer Restriktionsfragment-Analyse von PCR-Amplifikaten, die an einem Ende eine Fluoreszenzmarkierung tragen. Die PCR-Amplifikate wurden wie unter den bereits beschriebenen PCR-Bedingungen (II.5.6.1) gewonnen. In diese Reaktion werden ein am 5'-Ende mit 5'-Carboxyfluorescein (FAM) markierter Primer und ein unmarkierter Primer eingesetzt. Die erhaltenen Amplifikate werden anschließend mit einem ausgewählten Restriktionsenzym geschnitten, wodurch nur das Muster der terminalen, fluoreszenzmarkierten Fragmente erfasst und ausgewertet wird.

5.7.1 Restriktion amplifizierter Genfragmente

Für die T-RFLP-Analyse der archaeellen Gemeinschaft des Profundalsediments wurde das Restriktionsenzym *TaqI* ($10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$, T^hCGA) verwendet. Um eine gute Auflösung der bakteriellen Gemeinschaft der untersuchten Sedimentproben mit Hilfe der T-RFLP-Analyse zu erreichen, wurden FAM-markierte 16S rRNA-Gen-Amplifikate mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt und analysiert (*HaeIII*, *HhaI*, *MspI*, *RsaI* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt), *TaqI* (Promega, Mannheim)). Hierbei zeigte sich, dass die beste Auflösung mit *HaeIII* ($10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$, 5'-GG^hCC-3') und *MspI* ($10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$, C^hCGG) erreicht wurde.

Ein Restriktionsansatz setzte sich aus einer 100 ng DNA entsprechenden Menge des jeweiligen FAM-markierten 16S rRNA-Gen- oder 16S rcDNA-PCR-Produkts für Analysen der bakteriellen Gemeinschaft bzw. aus 50 ng DNA für Analysen der archaeellen Gemeinschaft, 1 μl Puffer (vom Hersteller), 0,3 μl des Restriktionsenzym (10 $\text{U } \mu\text{l}^{-1}$) und

0,1 µl BSA (100×) zusammen. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt und für 3 h bei 65°C (*TaqI*) bzw. 37°C (*HaeIII*, *HhaI*, *MspI*, *RsaI*) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben kurz auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung (Entsalzung) der Restriktionsansätze mit AutoSeqTM G-50-Chromatographiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NY, USA). Um eine Verdünnung des verdauten PCR-Amplifikates durch den auf der Säule befindlichen Puffer zu verhindern, wurden die Säulen zunächst bei 2650 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Herstellerangabe: 2000 g). Anschließend wurde das verdaute PCR-Produkt auf die Säule pipettiert und bei 2000 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

5.7.2 Identifizierung von Pseudo-T-RFs („Mung bean“-Nuklease)

Das Muster von T-RFLP-Profilen kann neben PCR-bedingten Faktoren auch durch restriktionsbedingte Faktoren beeinflusst werden (Egert und Friedrich, 2003). Liegen nach der PCR Teile des 16S rRNA-Gen-Amplikons als Einzelstrang vor, so können partiell verdaute PCR-Produkte entstehen, die zu zusätzlichen, unerwarteten, terminalen Restriktionsfragmenten (≡Pseudo-T-RFs) im T-RFLP-Muster führen. Um die Häufigkeit des Auftretens solcher Pseudo-T-RFs zu untersuchen wurde vor dem Restriktionsverdau zunächst eine Behandlung der PCR-Amplifikate mit „Mung bean“-Nuklease, wie von Egert und Friedrich (2003) beschrieben, durchgeführt.

Ein Restriktionsansatz setzte sich aus einer 1000 ng DNA entsprechenden Menge des jeweiligen FAM-markierten bakteriellen 16S rRNA-Gen-Amplikons, 10 µl 10× „Mung bean“-Puffer (vom Hersteller) und 0,5 µl des „Mung bean“-Nuklease (10 U µl⁻¹) zusammen. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt und für 1 h bei 30°C inkubiert. Um die „Mung bean“-Nuklease zu inaktivieren wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1 [v/v/v]), sowie eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24:1 [v/v]) durchgeführt. Nach Fällung der Nukleinsäure mit 0,7 Vol. 100 %igem Isopropanol wurde das Pellet mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und in 25 µl EB-Puffer (Qiagen) gelöst. Anschließend erfolgte die Restriktion und Analyse der „Mung bean“-Nuklease behandelten PCR-Amplifikate wie unter II.5.7.1 und II.5.7.3 beschrieben.

5.7.3 Analyse verdauter PCR-Amplifikate

Die Analyse der verdauten PCR-Produkte erfolgte mittels Auftrennung im ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyser in einer 47 cm langen Kapillare mit dem Trennsystem POP-4[™] Polymer. 1 µl der verdauten Amplifikate wurde mit 0,25 µl eines internen Längenstandards (X-Rhodamine MapMarker 1000, Bioventures Inc., USA) und 12 µl Hi-Di[™] Formamid (ABI Inc.) gemischt, 3 min bei 95 °C denaturiert und kurz auf Eis gestellt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Zuweisung der Längen der fluoreszenzmarkierten T-RFs durch Vergleich mit dem internen Standard mit Hilfe der ABI PRISM[®] Genscan Software (Version 3.7, Applied Biosystems). Von T-RFLP-Profilen hoch diverser mikrobieller Gemeinschaften und von T-RFLP-Profilen, die anhand ökologischer Indizes (s. II.5.9.2) miteinander verglichen werden sollten, wurden die relativen Häufigkeiten der einzelnen T-RFs berechnet und diese im Ergebnisteil als Säulendiagramme dargestellt (Elektropherogramme dieser Proben siehe Anhang B). Für die Berechnung der relativen Häufigkeiten der T-RFs wurden Peaks ab einer Höhe von 100 relativen Fluoreszenzeinheiten mit einbezogen. T-RFLP-Profile der bakteriellen Gemeinschaft wurden anhand der Peak-Höhe, T-RFLP-Profile der archaeellen Gemeinschaft anhand der Peak-Fläche analysiert. Um die relativen Häufigkeiten detektierter T-RFs in verschiedenen T-RFLP-Profilen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Standardisierung der Gesamtsignalintensitäten der zu vergleichenden Proben nach Dunbar et al. (2000) durchgeführt. Zunächst wurde durch Addition der Signalintensitäten der einzelnen T-RFs innerhalb eines T-RFLP-Musters die kleinste Gesamtsignalintensität der zu vergleichenden T-RFLP-Muster ermittelt. Anschließend wurde die Gesamtsignalintensität des schwächsten Musters durch die Gesamtsignalintensität jedes einzelnen T-RFLP-Profils dividiert. Mit diesem für jede Probe ermittelten Faktor wurden die Peak-Höhe (*Bacteria*) bzw. -Fläche (*Archaea*) jedes T-RFs der einzelnen Proben multipliziert. Beim Vergleich von T-RFLP-Mustern sehr hoher Gesamtsignalintensitäten mit T-RFLP-Mustern sehr niedriger Gesamtsignalintensitäten muss jedoch berücksichtigt werden, dass vereinzelte T-RFs aus dem T-RFLP-Muster mit höherer Gesamtsignalintensität eliminiert werden können, wenn diese aufgrund der Standardisierung unter den gesetzten Schwellenwert (Höhe von 100 relativen Fluoreszenzeinheiten) fallen. Die relative Häufigkeit eines T-RFs in einem T-RFLP-Muster wurde dann mittels der Formel [13] berechnet. T-RFs mit einer relativen Abundanz von 1 % und größer 1 % wurden als diskrete T-RFs in den graphischen

Darstellungen der relativen Häufigkeiten im Ergebnisteil berücksichtigt, T-RFs mit einer relativen Häufigkeit kleiner 1 % wurden als „andere <1 %“ in den Diagrammen dargestellt.

$$A_p = \frac{n_i \times 100}{N} \quad [13]$$

A_p : relative Häufigkeit eines T-RFs [%]

n_i : standardisierte Signalintensität eines T-RFs (Höhe (*Bacteria*) bzw. Fläche (*Archaea*))

N : standardisierte Gesamtsignalintensität eines T-RFLP-Musters

5.8 Phylogenetische Analysen

5.8.1 Herstellung von Klonbibliotheken

Um phylogenetische Informationen über die aus den in T-RFLP-Analysen der 16S rRNA-Gene und der 16S rRNA vom Profundalsediment des See Genezareth gewonnenen T-RFs zu erhalten, wurden Klonbibliotheken von 16S rRNA-Gen- und revers-transkribierten 16S rRNA- (16S rcDNA)-Fragmenten angelegt, die vorher mittels *Bacteria*- und *Archaea*-spezifischen PCR-Bedingungen (s. II.5.6.1 und II.5.6.2) amplifiziert worden waren. Hierfür wurde das TOPO-TA-Cloning®-Kit (Invitrogen, de Schelp, Niederlande) verwendet. Diese Methode macht sich zunutze, dass die *Taq*-Polymerase in einer von DNA-Matrizen unabhängigen Reaktion die Addition von Desoxyadeninen an die 3'-Enden der PCR-Produkte katalysiert. Da der linearisierte Klonierungsvektor pCR®2.1 (10 ng μl^{-1}) am 3'-Ende einen Thymidin-Überhang besitzt, können die PCR-Produkte direkt mit dem Vektor ligiert werden. Die Ligationsreaktion erfolgte mit der Topoisomerase I, die kovalent an die Enden des Vektors gebunden ist. Es wurden 4 μl des PCR- bzw. RT-PCR-Produkts verwendet, um eine möglichst hohe Ausbeute an positiven Klonen zu erzielen. Das Ligationsprodukt wurde mittels Hitzeschock bei 42°C in chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen transformiert und diese für 1 h schüttelnd bei 37°C in SOC-Medium inkubiert. Die transformierten Zellen wurden dann auf LB-Ampicillin-X-Gal-Agarplatten (imMedia™ Amp Blue für *lacZ*⁺ AmpR rekombinanten *E. coli* Stamm K12; Invitrogen Life Technologies) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da der Vektor für eine Ampicillin-Resistenz kodiert, können ausschließlich Zellen wachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Die Detektion der Aufnahme von Fremd-DNA erfolgt mittels der Blau-Weiß-Selektion. Die Auswahl der positiven Klone erfolgte nach dreistündiger Inkubation der Platten bei 4°C, was zu einer

Verstärkung der Blaufärbung führte. Mit sterilen Zahnstochern wurden weiße Kolonien gepickt und auf eine Masterplatte übertragen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert. Um festzustellen, ob die Klone das richtige Insert enthalten, wurde eine PCR mit M13r- und M13f-Primern (s. Tabelle 11) durchgeführt. Die PCR-Produkte der Klone wurden mittels Agarosegelelektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel auf die richtige Länge überprüft. Positive Klone (korrekte Fragmentlänge) wurden durch eine Sequenzierung weiteranalysiert.

5.8.2 Lösungen und Puffer für die Sequenzanalyse

40 % Page-Plus (BioRad Laboratories, München, gebrauchsfertig)

TEMED (BioRad Laboratories, München, gebrauchsfertig)

10 % APS

APS (in HPLC-Wasser)	10 % [w/v]
----------------------	------------

TTE-Puffer 10×

Tris	60,55 g l ⁻¹
TAPS	121,65 g l ⁻¹
Na ₂ EDTA	3,72 g l ⁻¹

5.8.3 Sequenzanalyse der Klone

Die verwendete Sequenzierungsmethode basiert auf dem Kettenabbruch-Prinzip, das von Sanger (1977) entwickelt worden ist. In die Sequenzierreaktion wird ein Gemisch von normalen Desoxynukleotiden (dNTPs) und 5'-fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) eingesetzt. Der Einbau eines Didesoxynukleotids (= Terminator) während der enzymatischen DNA-Neusynthese führt zum Kettenabbruch an diesem Strang. Die so entstandenen terminal markierten Fragmente unterschiedlicher Länge werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Sequenzierung wurde mit dem „ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstelleranweisung durchgeführt. Die Unterscheidung der vier Didesoxynukleotide erfolgte mit Hilfe von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die an die Didesoxynukleotide gekoppelt waren. Da die Fluoreszenzfarbstoffe Emissionsmaxima

verschiedener Wellenlängen besitzen (535-605 nm) können alle vier Didesoxynukleotide in einen Ansatz einer Sequenzierreaktion eingesetzt werden.

Sequenzierreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Der verwendete „Terminator Ready Reaction Mix“ v1.1 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) enthielt bereits die Enzyme (thermostabile Pyrophosphatase und *AmpliTaQ*® DNA Polymerase, FS), Puffer, Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide. Zu dem „Mix“ wurde nur noch der entsprechende Sequenzier-Primer (s. Tabelle 11) und die zu sequenzierende DNA (100 ng) gegeben und mit H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Das Temperaturprofil der Sequenzierreaktion ist in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Temperaturprofil der Sequenzierreaktion.

Sequenzier- Primer	Zielgruppe	At [°C]	Et [°C]	iDd [s]	Dd [s]	Ad [s]	Ed [s]	Zyklen- anzahl
T7f	Vektorinsert	50	60	30	10	5	4	20
M13r	Vektorinsert	50	60	30	10	5	4	20

Primer-Anlagerungstemperatur (Annealing = At); Elongationstemperatur (Et); Dauer der initialen Denaturierungsphase (iDd); Dauer der Denaturierung (Dd); Dauer der Primeranlagerung (Ad); Dauer der DNA-Synthese während der zyklischen Wiederholung (Elongation = Ed).

Die Aufreinigung der Sequenzierreaktion-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben mit AutoSeqTM G-50-Chromatographiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NY, USA). Das Eluat wurde unter Vakuum in der DNA-SpeedVac (DNA 110, Savant) bei 45°C für 45 min getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 2 µl Formamid Loading Dye (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg) resuspendiert, 3 min bei 92°C denaturiert und auf Eis gestellt.

Die Fragmentanalyse der Sequenzierreaktions-Produkte erfolgte durch eine gekoppelte Elektrophorese- und Detektionseinheit (377 DNA-Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt) bei 3000 V, 40 W, 60 mA über eine Dauer von 19,5 h. Die Auftrennung nach Molekülgröße erfolgte in einem 4,25 %igen Polyacrylamidgel, das nach Anweisung des Herstellers gegossen wurde. Ein Argonlaser tastet das Gel horizontal ab und regt bei einer Wellenlänge von 514 und 488 nm markierte DNA-Fragmente zur Sekundärstrahlung an. Diese Sekundärstrahlung der fluoreszenzmarkierten Terminatoren wird von einem Photomultiplier erfasst und mit Hilfe einer Computeranalysesoftware (DNA Sequencing Software Version 2.1.1, Applied Biosystems, Weiterstadt) in Sequenzdaten umgesetzt.

5.8.4 Phylogenetische Analyse der Klonsequenzen

Die Rohsequenzdaten wurden als Elektropherogramme mit Hilfe des Seqman II-Programms (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) kontrolliert und editiert. Vektor- und Primersequenzen wurden entfernt und Teilsequenzen wurden zu Gesamtsequenzen zusammengesetzt. Die so bearbeiteten Sequenzen wurden für eine erste phylogenetische Einordnung mittels NCBI megaBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.html>) mit Sequenzeinträgen in öffentlichen Datenbanken verglichen. Die Sequenzen nächst verwandter kultivierter Organismen und nächst verwandter Umweltklone wurden von öffentlichen Datenbanken bezogen und in die ARB-Datenbank (ssu_jan03; ARB Programm-Paket) importiert (Ludwig et al., 2004).

Die phylogenetische Einordnung und Verrechnung von 16S rRNA-Gen- und 16S rcDNA-Sequenzdaten wurde mit Hilfe des ARB Programm-Pakets durchgeführt (Version Linux Beta030822; <http://www.arb-home.de>; Ludwig et al., 2004). Neu importierte Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe des automatischen Fast Aligners (Version 1.03) mit nah verwandten Sequenzen in ein Alignment gebracht und anschließend manuell überprüft. Für eine erste phylogenetische Einordnung wurden die neu importierten Sequenzdaten unter Anwendung der Maximum-Parsimony Kriterien (Fitch, 1971) in einen bereits bestehenden Stammbaum der ARB-Datenbank, der einen Großteil der zur Zeit verfügbaren SSU rDNA-Sequenzen enthält, integriert. Hierbei wurde die zu analysierende Sequenz derjenigen Sequenz in der Datenbank zugeordnet, zu der die geringste Anzahl an Nuklotidsubstitutionen berechnet wurde.

Zur Identifizierung von chimären Sequenzen, d. h. Mischprodukten aus Sequenzen phylogenetisch verschiedener Organismen, die als Artefakte während der PCR entstehen können, wurden die Sequenzen mittels des Bellerophon-Servers (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/doc/doc.html>; Huber et al., 2004) und des CHIMERA_CHECKs (version 2.7) des Ribosomal Database Projects (RDP) (<http://35.8.164.52/cgi/chimera.cgi?su=16S>) überprüft. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung der terminalen Sequenzpositionen am 5'- und 3'-Ende der 16S rRNA-Gen-Sequenzen mit Hilfe des von Ludwig et al. (1997) beschriebenen „fractional treeing“ in ARB. Ergab die Verrechnung der vorderen Hälfte einer Sequenz eine signifikant andere phylogenetische Einordnung als die hintere Hälfte, so deutete dies auf eine chimäre Sequenz hin, die dann von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit berechneten phylogenetischen Dendrogramme wurden auf Grundlage einer von der ARB-Software berechneten und evolutionär korrigierten Distanzmatrix, basierend auf einem paarweisen Vergleich aller zu verrechnender Sequenzen, mit Hilfe des Neighbor-Joining Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) erstellt. In die Berechnungen gingen neben den eigenen Klonsequenzen, die Sequenzen ihrer nächsten Verwandten aus öffentlichen Datenbanken sowie eine Vielzahl von Sequenzen bereits kultivierter *Bacteria* und *Archaea* als Referenzsequenzen ein. Um durch partielle Sequenzen erzeugbare Rekonstruktionsartefakte zu verhindern, wurde für jedes in dieser Arbeit dargestellte Dendrogramm zunächst ein phylogenetischer Stammbaum, ein sogenannter Grundbaum, aus Vollsequenzen (>1400 bp) berechnet. Hoch variable Regionen innerhalb des 16S rRNA-Gens wurden durch die Verwendung von Filtern, die mit der ARB-Software zur Verfügung gestellt wurden, von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen. Durch den Einsatz dieser Filter wurde die Berechnung der phylogenetischen Dendrogramme auf Nukleotidpositionen des 16S rRNA-Gens beschränkt, die mit 50 bis 100 % bei allen *Bacteria* bzw. *Archaea* konserviert vorliegen. Die in dieser Arbeit erzeugten Klonsequenzen und andere kürzere zu diesen Klonsequenzen verwandte Sequenzen wurden nachträglich mit Hilfe der „Quick Add Maximum Parsimony“-Funktion des ARB-Programms in die zuvor berechneten Grundbäume eingefügt, wodurch die generelle Topologie des erzeugten Baumes nicht mehr verändert wurde (Ludwig et al., 1998). Da die meisten der in dieser Arbeit in Dendrogrammen dargestellten Klonsequenzen keine neue Entwicklungslinie offenbarten, wurden keine zusätzlichen phylogenetischen Berechnungen mit anderen phylogenetischen Algorithmen durchgeführt, um die mittels Neighbor-Joining ermittelte Topologie der Dendrogramme zu überprüfen. Eine Ausnahme stellte das Dendrogramm der zum Phylum der „*Endomicrobia*“ verwandten Klonsequenzen dar, dessen Topologie zusätzlich durch weitere Berechnungen mit der Maximum-Likelihood-basierenden Methode FastDNAML (Ludwig et al., 2004) und TREE-PUZZLE (Schmidt et al., 2002) bestätigt wurde.

Mit Hilfe der in ARB integrierten *in silico* T-RFLP-Analyse-Software wurde von allen erzeugten Klonsequenzen die terminale *Hae*III-Restriktionsschnittstelle (*Bacteria*) bzw. *Taq*I-Restriktionsschnittstelle (*Archaea*) bestimmt, um die in der T-RFLP-Analyse der Umweltproben detektierten T-RFs phylogenetischen Gruppen zuordnen zu können. Zusätzlich wurden zufällig ausgewählte Klonsequenzen, die ein bestimmtes T-RF zeigten, auf ihr *in vitro* T-RF untersucht, um die Zuordnung zu phylogenetischen Gruppen der mittels *in silico* bestimmten T-RFs zu bestätigen.

5.9 Berechnungen ökologischer Indizes

5.9.1 Abschätzung des Artenreichtums und der Diversität im Profundalsediment

Für die Abschätzung des bakteriellen Artenreichtums innerhalb des Profundalsediments des See Genezareth wurde zunächst mit Hilfe des ARB-integrierten PHYLIP Distance-Matrix-Programms (Version 3.573c) unter Verwendung des Kimura 2-Parameter Distanzmodells eine Ähnlichkeitsmatrix der zu untersuchenden 16S rRNA-Gen-Klonsequenzen erzeugt. Als Arten wurden Klone definiert, deren 16S rRNA-Gene eine Sequenzidentität von mindestens 97 % aufwiesen (Stackebrandt und Goebel, 1994). Der potentiell vorhandene bakterielle Artenreichtum innerhalb des mit 16S rRNA-Gen Klonbibliotheken untersuchten Profundalsediments wurde mit Chao1 als nicht-parametrischem Indikator mittels des Programms EstimateS (Version 7.5), wie von Hughes et al. (2001) beschrieben, berechnet [14].

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2} \quad [14]$$

S_{Chao1} : potentiell vorhandener Artenreichtum

S_{obs} : Anzahl tatsächlich gefundener Arten

n_1 : einmal gefundene Arten

n_2 : zweimal gefundene Arten

Ein Vergleich des geschätzten Artenreichtums mit der tatsächlich gefundenen Anzahl an Arten zeigt, inwieweit der Klonierungsansatz mit seiner notwendigerweise beschränkten Anzahl von untersuchten Klonen die Diversität im untersuchten System erfasst hat.

Zum Vergleich der bakteriellen Diversität der 16S rRNA-Gen-basierten Klonbibliotheken des Profundalsediments des See Genezareth mit Literaturwerten wurde der Shannon-Wiener Index (H') [15] und die Shannon-Evenness (E) [16] herangezogen:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad [15]$$

$$E = \frac{H'}{\ln S} \quad [16]$$

H' : Shannon-Wiener Index

p_i : relative Häufigkeit einer Art

E : Shannon-Evenness

S : Gesamtanzahl an Arten

5.9.2 Diversität und Ähnlichkeit von mikrobiellen Gemeinschaften

T-RFLP-Profile können untereinander mit Hilfe von ökologischen Indizes verglichen werden, wenn man die einzelnen T-RFs als Arten und ihre relative Höhe (bezogen auf die Gesamtpeakhöhe eines Profils) bzw. Fläche (bezogen auf die Gesamtpeakfläche eines Profils) als ein Maß für deren Häufigkeit interpretiert. Zum Vergleich der Diversität verschiedener Profile wurden der Shannon-Wiener Index (H') [15] und die Shannon-Evenness (E) [16] über die relativen Häufigkeiten der einzelnen T-RFs (p_i) und die Gesamtanzahl von T-RFs pro Profil (S) berechnet.

Die paarweise Ähnlichkeit von T-RFLP-Profilen wurde in Anlehnung an Dollhopf et al. (2001) über Morisita-Indizes (I_M) [17] verglichen. Mit diesem Index werden zwei Gemeinschaften auf Grundlage des Auftretens von Arten sowie ihrer Häufigkeit verglichen. Morisita-Indizes liegen zwischen 0 und 1, wobei 1 eine völlige (100 %ige) Identität der beiden verglichenen Gemeinschaften andeutet:

$$I_M = \frac{2 \sum n_{1i} n_{2i}}{(l_1 + l_2) N_1 N_2} \quad [17]$$

$$l = \frac{\sum_{i=1}^s (n_i (n_i - 1))}{N(N - 1)} \quad [18]$$

I_M : Morisita-Index

n_1 : einmal gefundene Arten

n_2 : zweimal gefundene Arten

n_i : Anzahl der Individuen der Art i

l : Dominanzindex nach Simpson

s : Gesamtanzahl der Arten in der untersuchten Gemeinschaft

N : Gesamtanzahl aller Individuen

6. Probenahme und Lagerung der Sedimentproben

6.1 Probenahme des Profundalsediments

Die Probenahme des Profundalsediments erfolgte im Januar 2003, Juli 2003, Juli 2004 und Oktober 2004 mit Hilfe eines Tessenow-Samplers (Tessenow et al., 1977) an der zentralen Messstation des See Genezareth (Station A, Abbildung 6) bei einer Tiefe von 38-42 m. Es wurden jeweils die oberen 10 cm von fünf Sedimentkernen (Durchmesser 5 cm) in einer Polyethylenflasche vereinigt und vor dem Verschließen mit Argon begast, um eine Oxidation des Sediments mit Sauerstoff während der Lagerung zu verhindern. Zwei intakte Kerne der Probenahme im Oktober 2004 wurden direkt nach dem Transport ins Labor für Experimente verwendet.

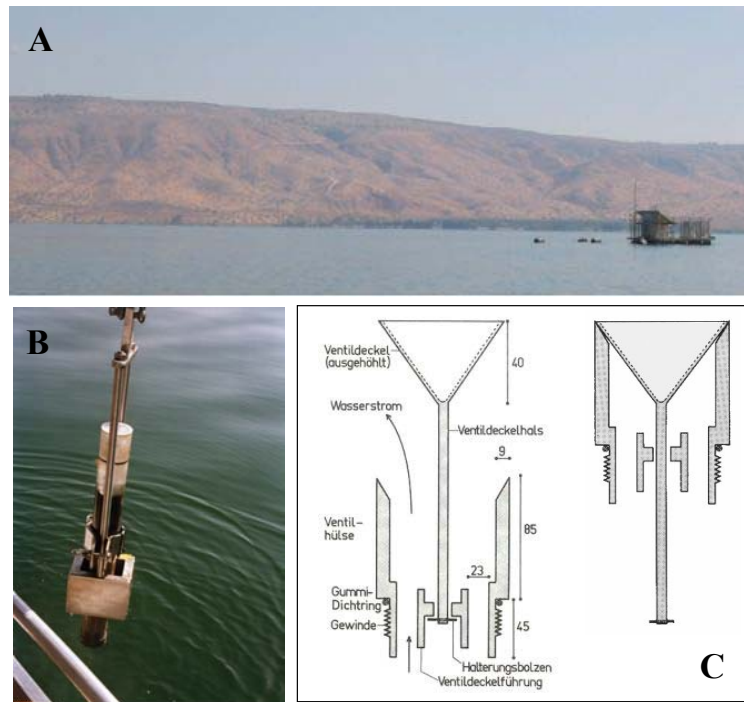


Abbildung 6: Probenahme des Profundalsediments vom See Genezareth. Zentrale Messstation A, an der tiefsten Stelle des Sees (A). Tessenow-Sampler mit Sedimentprobe (B). Schematische Darstellung des Tessenow-Sampler-Ventils (C).

6.2 Lagerung und Bearbeitung der Sedimentproben

Die Lagerung der Sedimentproben erfolgte in gasdichten Polyethylenflaschen unter einer Argonatmosphäre bei 4°C. Nach jedem Öffnen der Flaschen wurden diese erneut mit Argon gespült, um eine Oxidation der Probe zu verhindern. Eine kleinere Probe des Sediments wurde für molekulare Analysen in 50-ml Reaktionsgefäßen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) bei -75°C eingefroren.

7. Inkubationsexperimente

7.1 Herstellung von Sedimentaufschlammungen

Alle Inkubationsexperimente wurden als Sedimentaufschlammungen des Profundalsediments von Station A in sterilen, ausgeliterten 60-ml und 120-ml Serumflaschen oder 26-ml „Pressure tubes“ nach dem folgenden Schema vorbereitet.

Zunächst wurden für spätere Berechnungen alle Serumflaschen und „Pressure tubes“ leer gewogen. Dann wurden 5 ml bzw. 10 ml des Sediments mit einer Kolbenhubpipette unter ständigem Begasen mit Argon eingefüllt, worauf erneutes Wiegen folgte. Anschließend wurden vorsichtig 5 ml bzw. 10 ml bidestilliertes, unter Stickstoffatmosphäre autoklaviertes Wasser (anoxisch) zugegeben, wodurch eine 1:2 Verdünnung des Sediments entstand. Die Ansätze wurden nochmals gewogen. Nach dem Verschließen mit Butylgummistopfen wurden die Serumflaschen bzw. „Pressure tubes“ für 20 min abwechselnd mit Stickstoff begast und mittels einer Vakuumpumpe evakuiert. Der Wechsel zwischen Be- und Entgasen erfolgte durch ein automatisches System, das aus einem Drucksensor, an dem der maximale Ober- und Unterdruck festgelegt werden kann und einem Magnetventil besteht. Als maximaler Oberdruck wurden 0,5 bar und als maximaler Unterdruck –0,9 bar vorgegeben. Abschließend wurde ein Überdruck von 0,8 bar in den Flaschen eingestellt. Zum Austreiben des im Sediment gelösten Methans wurden die Flaschen bei 25°C für 1 h bei 120 rpm schüttelnd vorinkubiert. Danach wurde die Gasphase wie oben beschrieben erneut ausgetauscht. Alle Inkubationsexperimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, in drei Parallelen durchgeführt.

7.1.1 Einfluss der Temperatur auf die Methanproduktion

Die Bestimmung der Methanproduktionsraten erfolgte bei der *in situ* Temperatur von 15°C und bei 30°C. Hierfür wurden die Sedimentaufschlammungen mit einer Sedimentprobe vom Januar 2003 wie oben beschrieben angesetzt und direkt nach dem Begasen die Nullpunktmessungen für Methan, sowie für Kohlendioxid und Wasserstoff durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Über einen Zeitraum von 38 Tagen wurden in regelmäßigen Abständen Gasproben zur Analyse der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentrationen entnommen. Die Durchführung der gaschromatographischen Analysen und Berechnungen sind in Abschnitt II.4.4 und II.4.7.1 bis II.4.7.3 beschrieben.

7.1.2 Einfluss von Acetat auf die Methanproduktion

Um den Einfluss einer Konzentrationserhöhung von Acetat auf die Methanproduktion zu untersuchen, wurden wie oben beschrieben Sedimentaufschlammungen mit einer Sedimentprobe vom Januar 2003 angesetzt. Nach der Vorinkubation wurde Acetat (Natriumsalz) in einer Endkonzentration von 5,5 mM mit einer Spritze zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Nach der Acetatzugabe wurden in regelmäßigen Abständen die Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentrationen ermittelt. Zusätzlich wurden Aliquots des Porenwassers entnommen und auf organische Säuren untersucht (s. II.4.2).

7.1.3 Respiratorischer Index (RI) für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat

Acetat dient unter anaeroben Bedingungen nicht nur acetoklastischen methanogenen *Archaea* als Substrat, sondern kann auch von Mitgliedern der Domäne *Bacteria* z. B. unter Reduktion der anorganischen Elektronenakzeptoren Nitrat, Mn(IV), Fe(III) und Sulfat, der Reduktion von (Per)chlorat, der Dehalorespiration oder syntropher Oxidation umgesetzt werden (s. I.2). Die produzierten Gase Wasserstoff und Kohlendioxid dienen dann als Substrat für hydrogenotrophe Methanogene (Zinder, 1994). Die Bestimmung des respiratorischen Index für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat, der das Verhältnis des aus der ¹⁴C-markierten Methylgruppe entstandenen ¹⁴CO₂ zu der gebildeten Gesamtmenge an ¹⁴CO₂ und ¹⁴CH₄ angibt, ermöglicht die Berechnung des durch Oxidation umgesetzten Anteils gegenüber dem durch acetoklastische Methanogenese gespaltenen Anteil. Ein RI-Wert von ≤0,2 wurde als charakteristisch für den Umsatz von Acetat durch acetoklastische Methanogenese definiert (Conrad und Schütz, 1988). Die Bestimmung des RI-Wertes ermöglicht es daher, Rückschlüsse auf Prozesse im untersuchten Modellsystem zu ziehen.

Für die Bestimmung des RI-Wertes des Profundalsediments (Sedimentprobe Juli 2003 und bei 4°C gelagerte Probe vom Juni 1999) wurden wie unter II.7.1 beschrieben Sedimentaufschlammungen angesetzt (10 ml in 60-ml Serumflaschen) und 1 ml einer [2-¹⁴C]-Acetat-Lösung (58 mCi mmol⁻¹; Amersham-Buchler), d. h. eine $37,1 \times 10^5$ Bq entsprechende Menge bzw. 0,173 µmol Acetat, injiziert. Anschließend wurde die Gasphase in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des GC-RAGA-Systems (s. II.4.5.2) analysiert. Die Bestimmung des RI-Wertes erfolgte nach vollständiger Umsetzung des [2-¹⁴C]-Acetats und Ansäuerung der Sedimentaufschlammungen mit 1 ml H₂SO₄ (1 M), die nach einer

guten Durchmischung, eine Überführung des gelösten Kohlendioxid in die Gasphase bewirkte und somit die Messung der totalen $^{14}\text{CO}_2$ -Konzentration ermöglichte.

7.1.4 Identifizierung der acetatverwertenden mikrobiellen Populationen im Profundalsediment des See Genezareth

In diesem Inkubationsexperiment mit Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments wurde die Technik des Stable-Isotope-Probing (s. II.5.5) angewandt, um archaelle und bakterielle Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft des Profundalsediments zu identifizieren, die im anoxischen Profundalsediment an der Umsetzung von Acetat beteiligt sind.

Dieses Inkubationsexperiment wurde in vier verschiedenen Ansätzen mit der Zugabe von 5,5 mM der Natriumsalze von nicht-markiertem Acetat, $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Acetat}$ (99,99 %; ISOTECTM, Miamisburg, USA), vollständig markiertem $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Acetat}$ (99,99 %; ISOTECTM, Miamisburg, USA) und ohne Acetat (Kontrollansatz) in vorbereiteten Sedimentaufschlämmungen der Sedimentprobe vom Juli 2003 durchgeführt. In die Sedimentaufschlämmungen, die für die Extraktion von 16S rRNA und anschließendem rRNA-basierendem Stable-Isotope-Probing (RNA-SIP) herangezogen wurden, erfolgte die Zugabe von vollständig markiertem $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Acetat}$. Nach der Zugabe des Acetats wurde in regelmäßigen Abständen die Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentrationen ermittelt. Die Gasphase der mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Acetat}$ inkubierten Sedimentaufschlämmungen wurde zusätzlich am GC-C-IRMS analysiert, um einen Hinweis auf die acetatverwertenden Prozesse in den Sedimentaufschlämmungen zu erlangen (s. II.4.6.1 und RI-Wert II.7.1.3). Um den Umsatz des Acetats zu verfolgen, wurde das Porenwasser der Inkubationen mittels HPLC analysiert. Konnte kein Acetat mehr detektiert werden, erfolgte die erneute Zugabe von 5,5 mM Acetat mit einer Spritze. Nach einer Inkubationszeit von null, zehn und 18 Tagen erfolgte die Extraktion der Nukleinsäure (s. II.5.1) aus den mit $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Acetat}$ inkubierten Ansätzen. Nach erfolgtem DNase-Verdau (s. II.5.2) wurde die RNA mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (CsTFA-Gradientenmedium) (s. II.5.5) je nach Grad der ^{13}C -Markierung im Gradienten angeordnet und konnte nach dem Aliquotieren in einzelne Fraktionen mittels „real-time“-RT-PCR mit domänespezifischen *Archaea*- und *Bacteria*-Primern quantifiziert werden. Die Struktur der aktiv an der Umsetzung des Acetats beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft wurde mit Hilfe der T-RFLP-Methode (s. II.5.7), basierend auf 16S rRNA, untersucht.

7.1.5 Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse in das Profundalsediment des See Genezareth

In diesem Inkubationsexperiment mit Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments wurde mittels vergleichender, 16S rRNA-basierender T-RFLP-Analyse und der Technik des Stable-Isotope-Probing die Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse (in Form von *Peridinium gatunense*-Zellen) in das Profundalsediment untersucht, um die zu verschiedenen Zeiten im Sediment aktiv am Algenabbau beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren.

Dieses Inkubationsexperiment wurde in drei verschiedenen Ansätzen mit Sedimentaufschlämmungen der Sedimentprobe vom Juli 2004 durchgeführt. Ein Ansatz erfolgte mit der Zugabe von nicht-markierten *Peridinium gatunense*-Zellen, der zweite mit der Zugabe von ^{13}C -markierten Algenzellen (für RNA-SIP) und der dritte ohne Algenzugabe (Kontrollansatz). Die zugesetzte Menge von 8 mg Algen-TG pro Sedimentaufschlämmung (10 cm^3 Sediment; Annahme: 1 cm^2 Oberfläche bei Kerntiefe von 10 cm, s. II.6.1) entsprach dem Jahreseintrag an *Peridinium gatunense* von ca. 200 g FG m^{-2} Sediment. Nach der Zugabe der Algen wurde in regelmäßigen Abständen die Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffproduktion ermittelt. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Gasphase mittels GC-C-IRMS, um zum einen den Einfluss der Algenzugabe auf die Methanproduktion zu untersuchen und zum anderen um die Effizienz und den Verlauf der ^{13}C -Markierung zu verfolgen. Die Inkubationen wurden zum Zeitpunkt Null, nach einem Tag und nach sechs Tagen Inkubation abgebrochen, um den zeitlichen Verlauf des Algenabbaus und der daran beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft zu untersuchen. Bei jedem Inkubationsabbruch erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes und das Porenwasser wurde mittels HPLC auf vorhandene Fettsäuren analysiert. Das Porenwasser der Inkubationen mit ^{13}C -markierten Algenzellen wurde zusätzlich mittels eines HPLC-IRMS-Systems (s. II.4.6.2) analysiert, um den zeitlichen Verlauf der ^{13}C -Markierung in den detektierten Fettsäuren zu verfolgen.

Nach einer Inkubationszeit von null, einem und sechs Tagen erfolgte die Extraktion der Nukleinsäure (s. II.5.1) aus den Ansätzen ohne Algenzugabe und aus den Ansätzen mit der Zugabe nicht-markierter Algen. Aus den Ansätzen mit ^{13}C -markierten Algen erfolgte die Extraktion der Nukleinsäure nach sechs Tagen Inkubation. Mittels vergleichender, 16S rRNA-basierter T-RFLP-Analyse wurde der zeitliche Verlauf der Struktur der aktiv am Algenabbau beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft nach null, einem und sechs Tagen

Inkubation untersucht. Eine zusätzliche Analyse der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft mittels RNA-SIP wurde von dem Ansatz nach sechstägiger Inkubation mit ^{13}C -markierten Algen und vom Kontrollansatz durchgeführt.

7.1.6 Einfluss von Algenbiomasse auf die Methanproduktion in verschiedenen Sedimenttiefen

Die Zugabe von *P. gatunense*-Zellen zu intakten Sedimentkernen sollte die Untersuchung des Abbaus sedimentierender Algenbiomasse und dessen Einfluss auf die Methanproduktion in verschiedenen Tiefen des Profundalsediments an Station A ermöglichen.

Hierfür wurden Sedimentkerne vom Oktober 2004 mit einer dem Jahreseintrag von 200 g FG m^{-2} Sediment entsprechenden Menge Algen überschichtet (157 mg Algen-TG pro Kern; \varnothing 5 cm) und bei 15°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Kerne ohne Algen inkubiert. Nach sechs Tagen Inkubation wurden die Kerne in 1 cm (0-4 cm), 2 cm (4-6 cm) und 3 cm (6-12 cm) dicke Schichten geschnitten. Zur Ermittlung der Methanproduktionsraten der verschiedenen Tiefen wurden jeweils 5 ml der Sedimentschichten und 5 ml bidestilliertes Wasser in Pressure-Tubes (s. II.7.1) bei 15°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen die Methanproduktion gemessen. Zusätzlich wurde das Porenwasser aller Sedimentschichten mittels HPLC-Analyse auf Fettsäuren untersucht.

7.1.7 Übersicht der Inkubationsexperimente

Tabelle 22: Übersicht der durchgeführten Inkubationsexperimente.

Probenahme Sediment	Inkubationsbedingungen			Chemische und physikalische Analysen							Molekulare Analysen		
	C-Quelle	Temperatur		GC		RAGA-GC	GC-C-IRMS	HPLC-IRMS	HPLC				
		Algen	15°C	30°C	CH ₄					CO ₂		H ₂	¹⁴ CH ₄
01.2003			+	+	+	+	+						
01.2003	nicht-markiert		+	+	+	+	+					+	
07.2003	[2- ¹⁴ C]-markiert		+	+	+	+	+						
07.2003	[2- ¹⁴ C]-markiert		+	+	+	+	+						
07.2003	nicht-markiert [2- ¹³ C]-markiert [U- ¹³ C]-markiert		+	+	+	+	+		+	+	+	+	RNA-Extraktion RNA-SIP T-RFLP Klonbibliotheken
07.2004	nicht-markiert ¹³ C-markiert		+	+	+	+	+		+	+	+	+	RNA-Extraktion RNA-SIP T-RFLP Klonbibliotheken
10.2004	nicht-markiert		+	+	+	+	+					+	

III. Ergebnisse

1. Die mikrobielle Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth

1.1 Abundanz archaeeller und bakterieller 16S rRNA-Gen-Kopien

Die Abundanz von *Archaea* und *Bacteria* in den oberen 0-10 cm des Profundalsediments wurde mittels quantitativer „real-time“ PCR mit domänespezifischen Primern (s. II.5.6.3) in drei verschiedenen Sedimentproben (Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004) bestimmt.

Die Anzahl archaeeller und bakterieller 16S rRNA-Gen-Kopien zeigte nur eine geringe Schwankung zwischen den drei Sedimentproben (Abbildung 7), mit einem Maximum bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gen-Kopien in der Sedimentprobe vom Juli 2003. Im Durchschnitt wurden $1,17 \pm 0,9 \times 10^8$ archaeelle und $1,88 \pm 0,28 \times 10^{10}$ bakterielle 16S rRNA-Gen-Kopien detektiert.

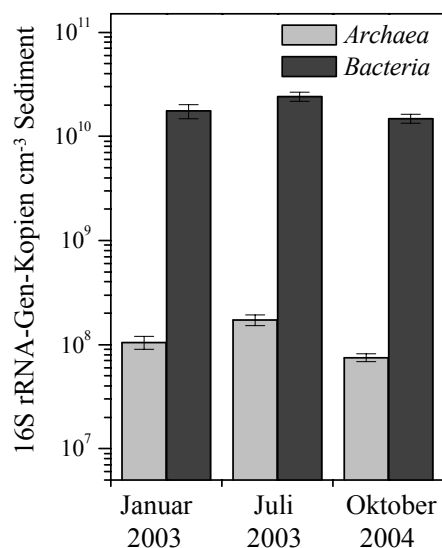


Abbildung 7: Anzahl bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gen-Kopien im Profundalsediment (0-10 cm) des See Genezareth von Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004, quantifiziert mittels quantitativer “real-time” PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier paralleler quantitativer PCR-Messungen von jeweils drei parallelen DNA-Extraktionen pro Zeitpunkt.

1.2 Struktur und phylogenetische Diversität der archaeellen Gemeinschaft

Die Struktur der archaeellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth wurde mit Hilfe 16S rRNA-Gen-gestützter T-RFLP-Analysen in Sedimentproben vom Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004 untersucht (Abbildung 8). Um die archaeelle Diversität auf Grundlage der erzeugten T-RFLP-Profile der drei Sedimentproben vergleichen zu können, wurden zwei ökologische Indizes (s. II.5.9.2), der Shannon-Wiener Index (H') und die Shannon-Eveness (E), berechnet (Tabelle 23). Die paarweise Ähnlichkeit der T-RFLP-Profile wurde mit Hilfe des Morisita-Index (I_M) verglichen (Tabelle 23).

Tabelle 23: Anzahl an T-RFs mit relativer Abundanz >1 % in archaeellen T-RFLP-Profilen der drei Probenahmen (Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004) nach Restriktion mit *TaqI* sowie Diversitätsindizes und Ähnlichkeit basierend auf 16S rRNA-Profilen der archaeellen Gemeinschaft des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) des See Genezareth.

Parameter	Januar 2003	Juli 2003	Oktober 2004
Anzahl an T-RFs >1 %	7	7	7
Diversitätsindizes			
Shannon-Wiener (H')	1,54	1,48	1,39
Shannon-Eveness (E)	0,34	0,31	0,28
	Januar 2003:Juli 2003	Januar 2003:Oktober 2004	Juli 2003:Oktober 2004
Ähnlichkeit			
Morisita-Index (I_M)	88 %	88 %	92 %

In den archaeellen T-RFLP-Profilen der drei Sedimentproben wurden insgesamt sieben T-RFs nach Restriktion mit *TaqI* detektiert, die in allen Proben wiederzufinden waren. Die niedrigen Werte für die Shannon-Eveness (Tabelle 23) veranschaulichen, dass die relativen Häufigkeiten der detektierten T-RFs nicht gleichmäßig innerhalb eines T-RFLP-Musters verteilt waren. Diese niedrigen Werte reflektieren die Dominanz des 392-, 284- und >700-bp-T-RFs in allen drei Proben. Die durch paarweises Vergleichen der T-RFLP-Profile erhaltenen Morisita-Indizes zeigten, dass die Zusammensetzung der T-RFLP-Profile der drei Sedimentproben einander sehr ähnlich waren. Die Ähnlichkeiten lagen zwischen 88 und 92 %. Keiner der berechneten ökologischen Indizes deutete daher auf große Unterschiede in der Struktur der archaeellen Gemeinschaften in den drei Sedimentproben hin.

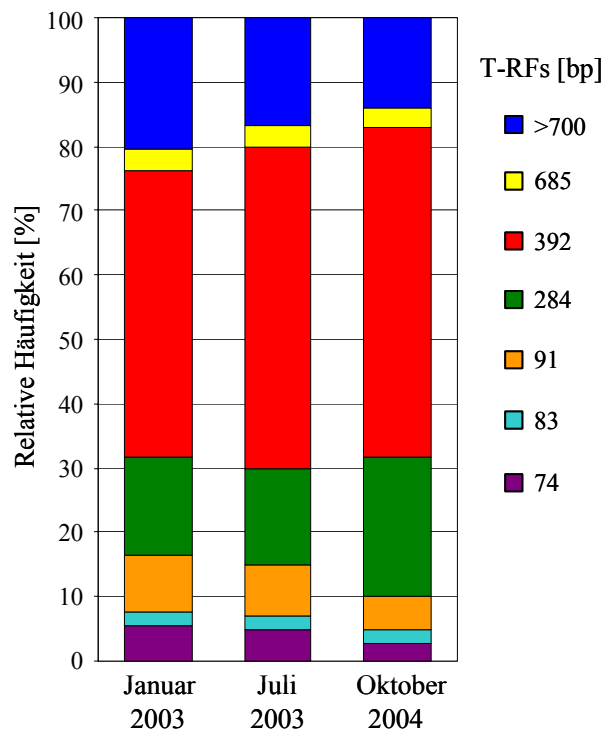


Abbildung 8: Relative Häufigkeiten archaeeller 16S rRNA-Genfragmente, amplifiziert aus Proben des Profundalsediments (0-10 cm) des See Genezareth von Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004. Dargestellt sind die gemittelten Häufigkeiten der einzelnen T-RFs von drei parallelen DNA-Extraktionen nach Restriktion mit *TaqI*. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren immer geringer als 1 %. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Anhand einer bereits vorhandenen Klonbibliothek archaeeller 16S rRNA-Gene aus dem Profundalsediment des See Genezareth (Nüsslein et al., 2001) war es möglich, die meisten der T-RFs phylogenetischen Gruppen zuzuordnen (Tabelle 24). Das T-RF der Länge 83 bp wurde durch eine 16S rRNA-Gen-Sequenz repräsentiert, die innerhalb der *Methanomicrobiaceae* gruppierte. Das T-RF der Länge 91 bp war charakteristisch für die Familie der *Methanobacteriaceae*. Das 392-bp-T-RF wurde sowohl den beiden hydrogenotrophen Familien *Methanomicrobiaceae* und *Methanospirillaceae* als auch der nicht-methanogenen „Group III“ (*Thermoplasma* und deren Verwandten) innerhalb der *Euryarchaeota* (Jurgens et al., 2000) zugeordnet. Organismen der „Group III“ wurden zusätzlich durch das T-RF >700 bp in den T-RFLP-Profilen des Profundalsediments repräsentiert. Da das T-RF der Länge 284 bp, das in einer relativen Häufigkeit von 15 bis 22 % innerhalb der einzelnen T-RFLP-Profile auftrat, sowie einige andere T-RFs geringerer Abundanz (74-bp-T-RF, 685-bp-T-RF) keiner dieser bereits veröffentlichten 16S rRNA-Gen-Sequenzen zugeordnet werden konnte, wurde in dieser Arbeit eine neue

Klonbibliothek von revers-transkribierter 16S rRNA (16S rcDNA) aus der Sedimentprobe vom Januar 2003 hergestellt (s. Tabelle 24; Anhang A; Tabelle 31). Insgesamt wurden 22 zufällig ausgewählte Klone mittels vergleichender Sequenzanalyse und T-RFLP-Analyse untersucht. In Abbildung 9 sind die 16S rcDNA-Klonsequenzen in einem phylogenetischen Dendrogramm mit weiteren repräsentativen Sequenzen der Domäne der *Archaea* dargestellt. Viele (59 %) der 16S rcDNA-Klonsequenzen zeigten das charakteristische T-RF der Länge 284 bp. Alle diese Sequenzen gruppieren innerhalb der acetoklastischen *Methanosaetaceae*. Mit 97 bis 99 % Sequenzidentität war *Methanosaeta concilii* das nächstverwandteste Isolat zu diesen 16S rcDNA-Klonsequenzen. Das T-RF der Länge 685 bp repräsentierte eine Klonsequenz, die verwandt zu Sequenzen innerhalb der *Methanomicrobiaceae* war.

Tabelle 24: Zuordnung von 16S rRNA-Gen- und 16S rcDNA-Klonsequenzen aus Klonbibliotheken vom Profundalsediment zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Archaea* und ihre Zuordnung zu T-RFs nach Restriktion mit *TaqI*.

Phylogenetische Gruppe	T-RF [bp]	(n) 16S rRNA-Gen-Klone ^a	(n) 16S rcDNA-Klone
unbekannte Zuordnung	74	ND	ND
<i>Methanomicrobiaceae</i>	83	(1)	ND
	392*	(21)	(5)
	685	ND	(1)
<i>Methanobacteriaceae</i>	91	(2)	ND
<i>Methanospirillaceae</i>	392*	(1)	(2)
<i>Methanosaetaceae</i>	284	ND	(13)
Group III (<i>Thermoplasma</i>) ^b	392*	(1)	ND
	>700	(4)	ND
<i>Euryarchaeota</i>			
nicht klassifizierte	580°	ND	(1)

Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. Die Anzahl detektierter 16S rRNA-Gen- und 16S rcDNA-Klone mit spezifischem T-RF sind in einer Klammer „()“ aufgeführt. T-RFs, die in mehr als einer phylogenetischen Gruppe detektiert wurden, sind mit einem Stern „*“ markiert.

ND: nicht detektiert.

^a 16S rRNA-Gen-Klone stammen aus einer früheren Studie über das Profundalsediment (Nüsslein et al., 2001).

^b Bezeichnung entsprechend Jurgens et al. (2000).

III. Ergebnisse

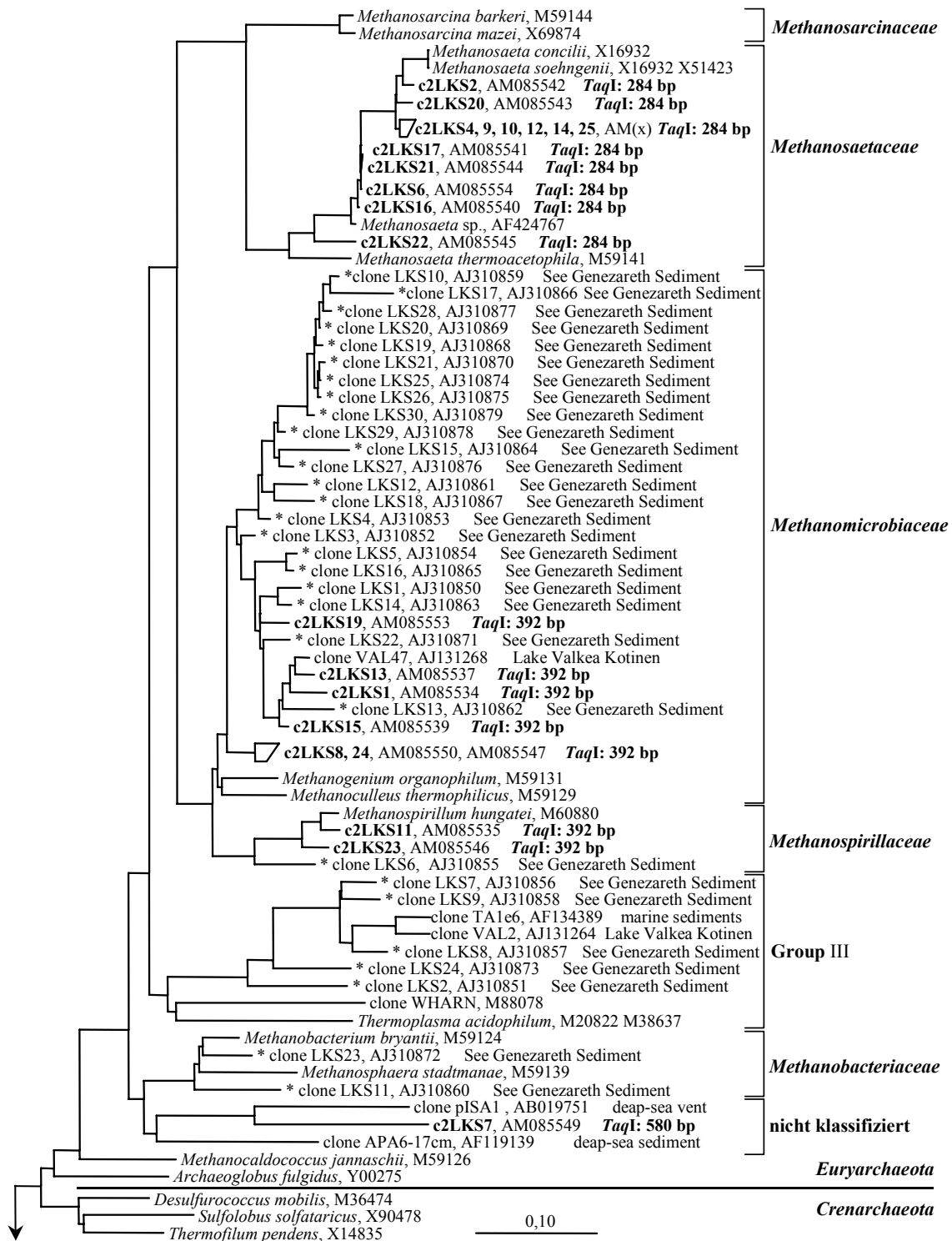


Abbildung 9: Phylogenetische Verwandtschaft von 16S rDNA-Sequenzen aus Sedimentproben des See Genezaireth zu 16S rRNA-Gen-Sequenzen einer früheren Studie über das Profundalsediment (mit einem Stern „*“ markierte Sequenzen; Nüsslein et al., 2001) und zu 16S rRNA-Gen-Sequenzen der Domäne *Archaea*. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Neighbor-Joining Methode unter Ausschluss der hochvariablen Regionen mit einem mit der ARB-Software bereitgestellten, archaeellen Filter (50 % Invarianz) durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die Längen der zugehörigen T-RFs resultieren aus *in silico* Restriktion der 16S rDNA-Sequenzen mit *TaqI*. Die „Accession numbers“ sind angegeben. (AM(x): AM085552, AM085551, AM085555, AM085536, AM085538, AM085548).

1.3 Struktur und phylogenetische Diversität der bakteriellen Gemeinschaft

Die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth wurde mit Hilfe 16S rRNA-Gen-gestützter T-RFLP-Analysen in Sedimentproben vom Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004 untersucht. Wie schon für die archaeele Gemeinschaft beschrieben (s. III.1.2), wurde als Maß für die bakterielle Diversität im Profundalsediment der Shannon-Wiener Index (H') und die Shannon-Eveness (E) für die T-RFLP-Muster der drei Proben berechnet. Die paarweise Ähnlichkeit der T-RFLP-Profile wurde mit Hilfe des Morisita-Index (I_M) verglichen (Tabelle 25).

Tabelle 25: Anzahl an T-RFs mit relativer Abundanz >1 % in bakteriellen T-RFLP-Profilen der drei Probenahmen (Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004) nach Restriktion mit *HaeIII* sowie Diversitätsindizes und Ähnlichkeit basierend auf 16S rRNA-Profilen der bakteriellen Gemeinschaft des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) des See Genezareth.

Parameter	Januar 2003	Juli 2003	Oktober 2004
Anzahl an T-RFs >1 %	30	27	32
Diversitätsindizes			
Shannon-Wiener (H')	3,07	3,00	3,21
Shannon-Eveness (E)	0,72	0,67	0,83
	Januar 2003:Juli 2003	Januar 2003:Oktober 2004	Juli 2003:Oktober 2004
Ähnlichkeit			
Morisita-Index (I_M)	90 %	79 %	94 %

Von fünf getesteten Restriktionsendonukleasen (s. II.5.7.1), wurde das Enzym *HaeIII* für die Analyse der bakteriellen Gemeinschaft ausgewählt, da mit diesem Enzym, neben *MspI*, die höchste Auflösung der bakteriellen Gemeinschaft erzielt wurde (definiert als größte Anzahl verschiedener T-RFs innerhalb der Muster) und gegenüber *MspI* zusätzlich die wenigsten Pseudo-T-RFs erzeugte (s. II.5.7.2). In allen drei Proben zusammen wurden insgesamt 36 verschiedene T-RFs identifiziert (Abbildung 10), was auf eine höhere Diversität der *Bacteria* im Vergleich zu der der *Archaea* schließen ließ. Dies wurde auch durch die Shannon-Wiener Indizes (H') für die bakteriellen T-RFLP-Profile bestätigt, für die höhere Werte (Tabelle 25) als für die der archaeele Gemeinschaft berechnet wurden (Tabelle 23). Genau wie in der archaeele Gemeinschaft gab es jedoch auch in der bakteriellen Gemeinschaft keine großen Unterschiede in der Diversität zwischen den verschiedenen Sedimentproben. Die relativ hohen Werte der Shannon-Eveness (E) demonstrierten, dass mehr als zwei Drittel aller T-RFs eine ähnlich niedrige relative Häufigkeit zwischen 1 und 3 % innerhalb einer Probe aufwiesen. Nur wenige der T-RFs

zeigten geringe Unterschiede in ihrer relativen Abundanz zwischen den drei Proben. Eine Ausnahme war das T-RF der Länge 62 bp, das eine relative Häufigkeit zwischen 13 und 3 % in den Sedimentproben von Januar 2003 und Oktober 2004 aufwies. Zusätzlich gab es nur wenige T-RFs mit einer geringen relativen Häufigkeit (zwischen 1,1 und 1,6 %), die jeweils nur in einer der drei Proben detektiert wurden. Die T-RFs der Länge 68, 83 und 248 bp traten nur in der Probe vom Januar 2003 auf, das T-RF der Länge 273 bp wurde hingegen nur in der Probe vom Juli 2003 detektiert und die T-RFs der Länge 76, 196, 205 und 240 bp nur in der Probe vom Oktober 2004. Die aus paarweisen Vergleichen der T-RFLP-Profile berechneten Moirisa-Ähnlichkeiten zeigten, dass die bakteriellen Gemeinschaften der Sedimentproben von Juli 2003 und Oktober 2004 mit 94 % Übereinstimmung die größte Ähnlichkeit aufwiesen. Die Sedimentprobe vom Januar 2003 war dagegen etwas weniger ähnlich mit denen vom Juli 2003 ($I_M = 90\%$) und Oktober 2004 ($I_M = 79\%$).

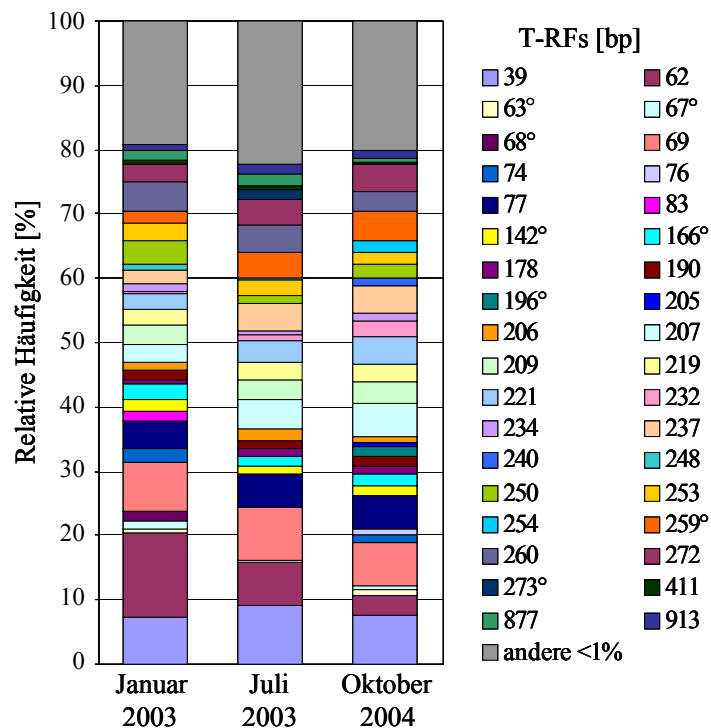


Abbildung 10: Relative Häufigkeiten bakterieller 16S rRNA-Genfragmente, amplifiziert aus Proben des Profundalsediments (0-10 cm) des See Genezareth von Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004. Dargestellt sind die gemittelten Häufigkeiten der einzelnen T-RFs von drei parallelen DNA-Extraktionen nach Restriktion mit *Hae*III. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren immer geringer als 1 %. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. T-RFs mit relativer Häufigkeit von 1 % und weniger als 1 % wurden als "andere $\leq 1\%$ " zusammengefasst. Mit einem Kreis „o“ markierte T-RFs wurden nur in der T-RFLP-Analyse und nicht in den Klonbibliotheken detektiert.

Da keiner der berechneten ökologischen Indizes, insbesondere die Morisita-Indizes, größere Unterschiede zwischen den Sedimentproben erkennen ließen, wurden für die Zuordnung der T-RFs zu phylogenetischen Gruppen nur zwei Klonbibliotheken der bakteriellen 16S rRNA-Gene von DNA-Extrakten der Sedimentproben von Januar 2003 (c1LKS [n = 46]) und Juli 2003 (c5LKS [n = 73]) herangezogen (s. Anhang A; Tabelle 32). Um die bakterielle Gesamtdiversität im Profundalsediment des See Genezareth zu untersuchen, wurden für die weiteren phylogenetischen Analysen (s. II.5.8.4) alle Klonsequenzen zusammengefasst betrachtet. Die phylogenetische Analyse von 98 16S rRNA-Gen-Klonsequenzen zeigte, dass 82 der Sequenzen mit 14 bekannten Taxa innerhalb der *Bacteria* verwandt waren (Tabelle 26). Fünf der Sequenzen gruppierten in neuen Entwicklungslinien, den sogenannten „candidate divisions“, innerhalb derer es noch keine kultivierten Vertreter gibt. Weitere fünf Sequenzen wurden Chloroplasten-DNA zugeordnet. Die meisten der 16S rRNA-Gen-Sequenzen repräsentierten vermutlich neue Spezies oder Genera, da ihre Sequenzidentität zu in öffentlichen Datenbanken erhältlichen Sequenzen weniger als 97 % bzw. 95 % betrug (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die meisten der Klonsequenzen konnten jedoch einer individuellen phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden, und gruppierten innerhalb dieser Gruppen mit Sequenzen, die bereits zuvor in verschiedenen anderen Habitaten detektiert wurden. Die meisten der 16S rRNA-Gen-Sequenzen waren am nächsten mit Sequenzen der *Proteobacteria* verwandt. Innerhalb dieser Sequenzen waren die *Deltaproteobacteria* die abundanteste Gruppe. Die *Deltaproteobacteria*-verwandten Klonsequenzen wurden wiederum von Sequenzen dominiert, die den Ordnungen der *Syntrophobacterales* und *Desulfobacterales* zugeordnet wurden (Abbildung 11). Die zweithäufigste Gruppe an 16S rRNA-Gen-Sequenzen war am nächsten mit der *Bacteroidetes-Chlorobi*-Gruppe (Hugenholtz, 2002) verwandt. *Bacteroidetes*-verwandte Sequenzen dominierten diese Gruppe (Abbildung 12). Weitere Klonsequenzen waren mit *Chloroflexi*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* und *Acidobacteria* verwandt (Tabelle 26). Einzelne repräsentative Klonsequenzen wurden den *Deferribacteres*, *Firmicutes* (*Clostridiales*), *Nitrospira* und den *Epsilonproteobacteria* zugeordnet. Fünf der Klonsequenzen wurden Umweltsequenzen aus den bereits beschriebenen candidate divisions OP3 und OP11 von einer heißen Quelle („Yellow hot spring“) bzw. TM6 und TM7 aus einem Torfhochmoor (Hugenholtz et al., 1998b) zugeordnet. Weitere sechs Klonsequenzen (c1LKS19, c5LKS51, c5LKS52, c1LKS86, c5LKS23 and c5LKS14) konnten nicht eindeutig definierten bakteriellen Taxa zugewiesen werden.

III. Ergebnisse

Tabelle 26: Zuordnung von 16S rRNA-Gen-Klonsequenzen aus Klonbibliotheken vom Profundalsediment des See Genezareth zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Bacteria* und ihre Zuordnung zu T-RFs nach Restriktion mit *Hae*III.

Phylogenetische Gruppe	T-RF [bp]								Σ
<i>Acidobacteria</i>	115	(1)	227	(1)	254*	(2)			4
<i>Bacteroidetes</i>									15
<i>Flavobacteriales</i>	614°	(1)							
nicht klassifiziert	39*	(3)	250	(2)	253	(2)	254*	(1)	
<i>Chlorobi</i>									6
<i>Chlorobiales</i>	74	(3)							
nicht klassifiziert	203	(2)	227	(1)					
<i>Chloroflexi</i>									8
<i>Dehalococcoides</i>	62	(3)	83*	(1)	204	(1)			
nicht klassifiziert	190*	(1)	212	(1)	220	(1)			
<i>Deferribacteres</i>	240*	(1)							1
<i>Firmicutes</i>									1
<i>Clostridiales</i>	298	(1)							
<i>Nitrospira</i>	232	(1)							1
<i>Planctomycetes</i>	249	(1)	267	(1)					2
<i>Verrucomicrobia</i>									5
<i>Verrucomicrobiales</i>	83*	(1)	178	(1)	234	(1)	248	(1)	
<i>Alphaproteobacteria</i>									3
<i>Rhodobacterales</i>	39*	(2)							
nicht klassifiziert	382	(1)							
<i>Betaproteobacteria</i>									4
<i>Hydrogenophilales</i>	221*	(1)							
<i>Methylophilales</i>	221*	(1)							
<i>Nitrosomonadales</i>	221*	(1)							
<i>Rhodocyclales</i>	219	(1)							
<i>Gammaproteobacteria</i>									6
<i>Legionellales</i>	323	(1)							
<i>Methylococcales</i>	69	(3)							
nicht klassifiziert	39*	(1)	190*	(1)					
<i>Deltaproteobacteria</i>									25
<i>Desulfobacterales</i>	209	(3)	211*	(1)	240*	(2)	277	(1)	
<i>Syntrophobacterales</i>	76	(1)	77	(3)	201	(1)	205*	(1)	
nicht klassifiziert	206	(1)	207	(5)	244*	(1)	272	(1)	
<i>Epsilonproteobacteria</i>									1
nicht klassifiziert	950	(1)							
candidate division OP3	306	(1)							1
candidate division OP11	237	(1)	396	(1)					2
candidate division TM6	186	(1)							1
candidate division TM7	211*	(1)							1
unbekannte Zugehörigkeit	205*	(3)	166°	(1)	221*	(2)			6
Chloroplast	877	(5)							5

Die Länge der T-RFs ist in Basenpaaren [bp] angegeben. Die Anzahl der 16S rRNA-Gen-Klone mit spezifischem T-RF ist in Klammern „()“ aufgeführt. T-RFs, die mit mehr als 1 % Abundanz in der T-RFLP-Analyse auftraten, sind „fett“ dargestellt. Die mit einem Stern „*“ gekennzeichneten T-RFs wurden in mehr als einer phylogenetischen Gruppe detektiert. Die mit einem Kreis „°“ gekennzeichneten T-RFs wurden nur in den Klonbibliotheken und nicht in der T-RFLP-Analyse detektiert.

III. Ergebnisse

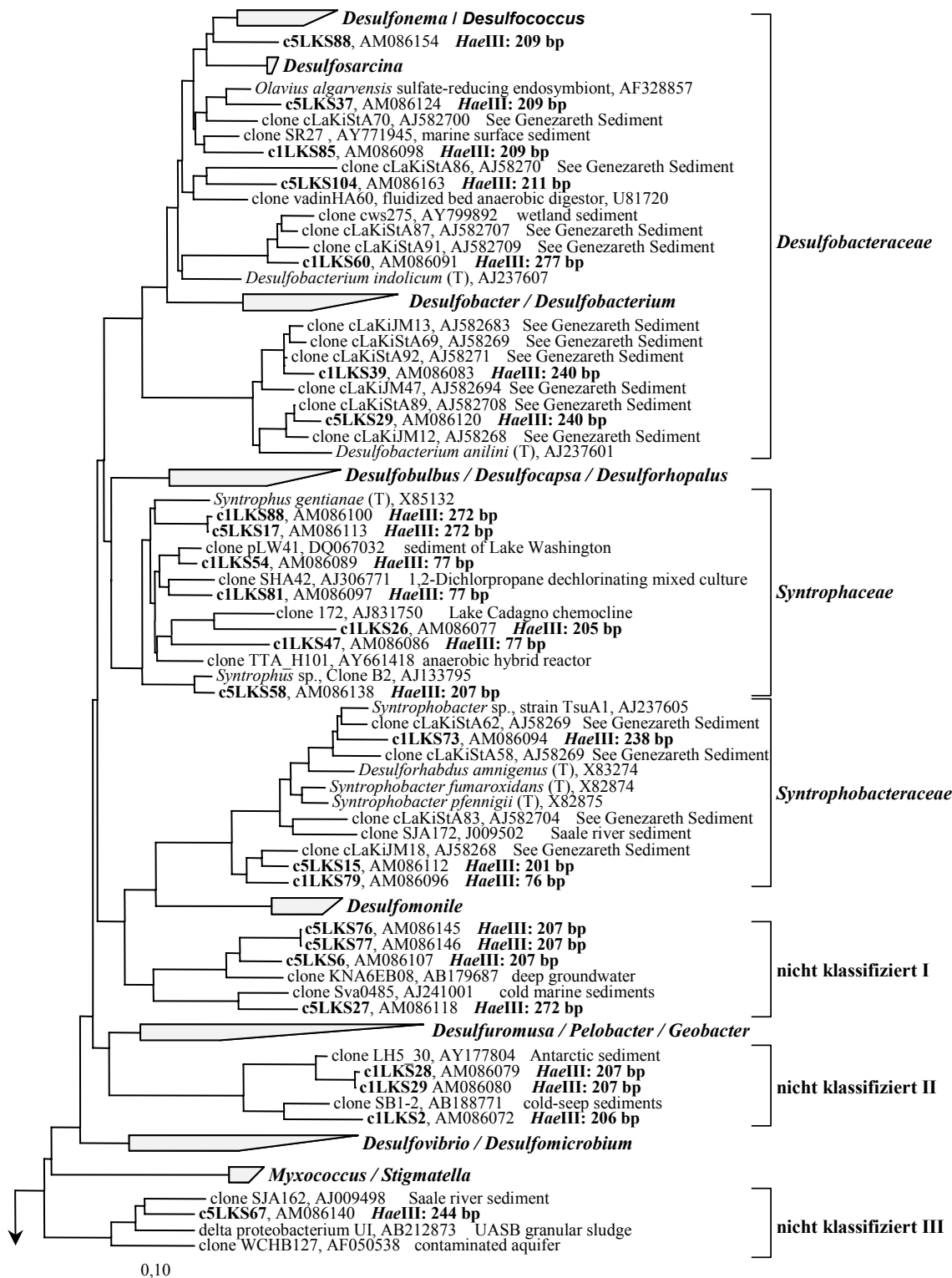


Abbildung 11: Phylogenetische Verwandtschaft von 16S rRNA-Gen-Sequenzen aus Sedimentproben des See Genezareth zu 16S rRNA-Gen-Sequenzen innerhalb der *Deltaproteobacteria*. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Neighbor-Joining Methode unter Ausschluss der hochvariablen Regionen mit einem mit der ARB-Software für die *Deltaproteobacteria* bereitgestellten Filter (50 % Invarianz) durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die Längen der zugehörigen T-RFs in [bp] resultieren aus *in silico* Restriktion der 16S rRNA-Gen-Sequenzen mit *HaeIII*. Die „Accession numbers“ sind angegeben.

III. Ergebnisse



Abbildung 12: Phylogenetische Verwandtschaft von 16S rRNA-Gen-Sequenzen aus Sedimentproben des See Genezareth zu 16S rRNA-Gen-Sequenzen innerhalb der *Bacteroidetes*-*Chlorobi*-Gruppe. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Neighbor-Joining Methode unter Ausschluss der hochvariablen Regionen mit einem mit der ARB-Software für die Domäne der *Bacteria* bereitgestellten, Filter (50 % Invarianz) durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die Längen der zugehörigen T-RFs in [bp] resultieren aus *in silico* Restriktion der klonalen 16S rRNA-Gen-Sequenzen mit *HaeIII*. Die „Accession numbers“ sind angegeben.

2. Biogeochemie des Profundalsediments des See Genezareth

2.1 Sedimentparameter

Der pH-Wert des Profundalsediments lag zu allen Probenahmezeitpunkten zwischen 7,6 und 7,8. Aufgrund des hohen Carbonatgehaltes (CaCO_3) von ca. 50 % ist das Profundalsediment sehr gut gegen Schwankungen im pH-Wert gepuffert.

Bei der Analyse des direkt nach der Probenahme gewonnenen Porenwassers des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) auf vorhandene organische Verbindungen mittels HPLC-Analyse wurde Acetat als einzige Fettsäure detektiert. Die Konzentration lag zwischen 12,1 und 31,6 μM . Nach längerer Lagerung (4 Wochen) bei 4°C konnte jedoch auch kein Acetat mehr im Porenwasser mittels HPLC-Analyse nachgewiesen werden.

Das Porenwasser der Sedimentprobe vom Januar 2003 wurde zusätzlich mit Hilfe eines Ionenchromatographen auf das Vorhandensein anorganischer Verbindungen wie Chlorid, Sulfat und Nitrat untersucht. Die Chloridkonzentration lag bei 142 mg l^{-1} , die Nitratkonzentration bei 0,958 μM und die Phosphatkonzentration bei 3,6 μM . Die Sulfatkonzentration in der Sedimentprobe vom Januar 2003 lag bei 18,7 μM .

Tabelle 27: Zusammenfassung der Sedimentparameter des Profundalsediment des See Genezareth von der Probenahmestelle Station A über den Untersuchungszeitraum Januar 2003 bis Oktober 2004.

CaCO_3 [%]	pH	Acetat ^a [μM]	Cl^- [mg l^{-1}]	NO_3^{2-} [μM]	PO_4^{2-} [μM]	SO_4^{2-} [μM]
50	7,6 – 7,8	12,1 – 31,6	142	0,958	3,6	18,7

^a Acetatkonzentration in direkt nach der Probenahme gewonnenem Porenwasser des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe.

2.2 Methanogenese im Profundalsediment des See Genezareth

In den anoxischen Sedimentschichten von Süßwasserseen wird komplexes organisches Material durch das Zusammenwirken metabolisch heterogener Mikroorganismen umgesetzt. Die Methanogenese und die Sulfatreduktion stellen hierbei die beiden wichtigsten terminalen elektronenakzeptierenden Prozesse im anaeroben Abbau dar. Hoher Eintrag an organischem Material in das Sediment führt jedoch schnell zu einer Erschöpfung des Sulfats. Unter diesen Bedingungen, die durch die Abwesenheit

anorganischer Elektronenakzeptoren charakterisiert werden, zählt die Methanogenese als terminaler Hauptprozess im anaeroben Abbau. Da alle Untersuchungen zum anaeroben Abbau im Profundalsediment des See Genezareth in Sedimentaufschlämmungen unter methanogenen Bedingungen durchgeführt wurden, wurde der Einfluss verschiedener Parameter, d. h. Temperatur, Acetatkonzentration, Zugabe von Biomasse in Form der Alge *Peridinium gatunense*, auf die Methanproduktion untersucht.

2.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Methanproduktion

In diesem Inkubationsexperiment wurde der Einfluss der Temperatur auf die Methanproduktion in Sedimentproben des Profundalsediments des See Genezareth untersucht. Die Inkubation wurde mit einer Sedimentprobe vom Januar 2003 bei *in situ* Temperatur von 15°C und bei 30°C als Sedimentaufschlämmungen durchgeführt (s. II.7.1.1).

Die Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffproduktion setzte bei beiden Temperaturen direkt mit Beginn der Inkubation ein (Abbildung 13). Die Methankonzentration stieg in den 30°C-Inkubationen um ein vielfaches schneller an als in den bei 15°C inkubierten Ansätzen. In den ersten drei Tagen lag die Methanproduktionsrate der bei 15°C inkubierten Ansätze bei $0,03 \pm 0,00 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ und stieg dann bis zum Ende der Inkubation auf $0,04 \pm 0,00 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ an. Die Methanproduktionsrate der bei 30°C inkubierten Ansätze lag in den ersten drei Tagen bei $0,39 \pm 0,01 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ und verringerte sich auf $0,22 \pm 0,01 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ zwischen Tag 3 und Tag 40 der Inkubation.

Die gemessenen Kohlendioxidkonzentrationen ließen bei beiden Temperaturen auf zwei Phasen unterschiedlicher Produktionsraten schließen (Abbildung 13 B), einer höheren Anfangsrate und einer etwas geringeren Bildungsrate im weiteren Verlauf der Inkubation. Diese scheinbar höhere Anfangsrate kann jedoch aufgrund des verzögerten Equilibrierens des gebildeten Kohlendioxid zwischen der Gasphase, der flüssigen Phase und dem in Sediment vorhandenen CaCO_3 bedingt worden sein. In den Inkubationen bei 15°C wurde über die gesamte Dauer der Inkubation nur ein geringer Kohlendioxidanstieg gemessen. Gegen Ende der Inkubation konnte in diesen Ansätzen kaum noch eine Zunahme der Kohlendioxidkonzentration detektiert werden, während die Kohlendioxidkonzentration in den bei 30°C inkubierten Ansätzen bis zum Ende der Inkubation stetig anstieg.

III. Ergebnisse

Der Wasserstoffpartialdruck stieg in beiden Ansätzen innerhalb der ersten drei Tage zunächst bis auf 0,12 Pa in den bei 15°C inkubierten Sedimentaufschlämmungen und bis auf 0,26 Pa in den bei 30°C inkubierten Sedimentaufschlämmungen an (Abbildung 13 C), sank in beiden Ansätzen aber bis Tag 6 wieder ab. Während sich der Wasserstoffpartialdruck in den bei 15°C inkubierten Ansätzen schließlich auf einen relativ konstanten Druck von ca. 0,06 Pa einstellte, kam es bei den bei 30°C inkubierten Ansätzen zu einem erneuten Anstieg des Wasserstoffpartialdrucks bis auf 0,95 Pa, bevor er sich auch hier wieder verringerte und einen Wert von 0,25 Pa annahm.

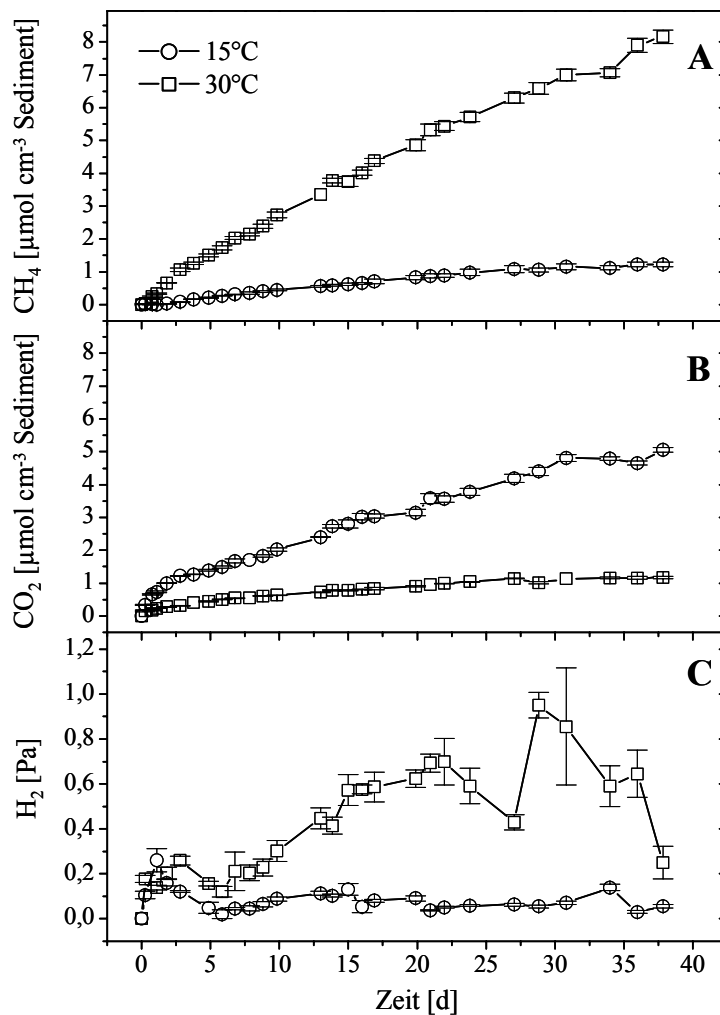


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der CH_4 - (A), CO_2 - (B) [μmol cm⁻³ Sediment] und H_2 -Konzentrationen [Pa] (C) während der Inkubation bei 15°C und 30°C in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Januar 2003. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

2.2.2 Einfluss von Acetat auf die Methanproduktion

In diesem Inkubationsexperiment wurde der Einfluss einer Erhöhung der Acetatkonzentration auf die Methanproduktion im Profundalsediment untersucht. Die Inkubation wurde mit einer Sedimentprobe vom Januar 2003 bei einer Temperatur von 30°C als Sedimentaufschlammungen durchgeführt (s. II.7.1.2). In vorbereitete Sedimentaufschlammungen wurde Acetat in einer Endkonzentration von 5,5 mM (55 μmol) hinzugefügt. Dies entsprach einer etwa 100fach höheren Konzentration als der *in situ* detektierten Konzentration (s. III.2.1).

Während einer Inkubationsdauer von 2,3 Tagen wurden ca. 10,34 μmol des Acetats mit einer Rate von $-0,51 \mu\text{mol Acetat cm}^{-3} \text{ Sedimentaufschlammung d}^{-1}$ umgesetzt.

In Abbildung 14 ist der zeitliche Verlauf der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffproduktion sowie die Abnahme der Acetatkonzentration von Inkubationen nach Acetatzugabe im Vergleich zu Inkubationen ohne Acetatzugabe (Daten aus III.2.2.1) dargestellt. Im Gegensatz zu den Ansätzen ohne Acetatzugabe, begann in den Ansätzen mit Acetatzugabe die Methanproduktion erst nach einer kurzen Lag-Phase (Abbildung 14 A). Nach der anfänglichen Lag-Phase stieg die Methankonzentration in diesen Ansätzen mit einer Rate von $0,98 \pm 0,09 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment d}^{-1}$ (bzw. $0,49 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sedimentaufschlammung d}^{-1}$) linear an. Die Acetatzugabe führte somit zu einer 2,5fachen Erhöhung der Methanproduktionsrate im Vergleich zu den Inkubationen ohne Acetatzugabe.

Die Kohlendioxidproduktion startete in beiden Ansätzen direkt mit Inkubationsbeginn (Abbildung 14 B). Innerhalb der ersten Stunden der Inkubation lag die Kohlendioxidproduktionsrate der Ansätze mit Acetatzugabe deutlich über der Anfangsrate der Inkubationen ohne Acetatzugabe, verringerte sich jedoch mit der Zeit und ging in einen flacheren linearen Anstieg während der späteren Phase der Inkubation über.

Der Wasserstoffpartialdruck stieg tendenziell in beiden Ansätzen während der Inkubation an. In den Inkubationen mit Acetatzugabe auf Drücke von 0,12 Pa, in denen ohne Acetatzugabe auf 0,25 Pa, wobei es in den Ansätzen ohne Acetatzugabe zu etwas größeren Schwankungen der gemessenen Wasserstoffpartialdrücke kam (Abbildung 14 C).

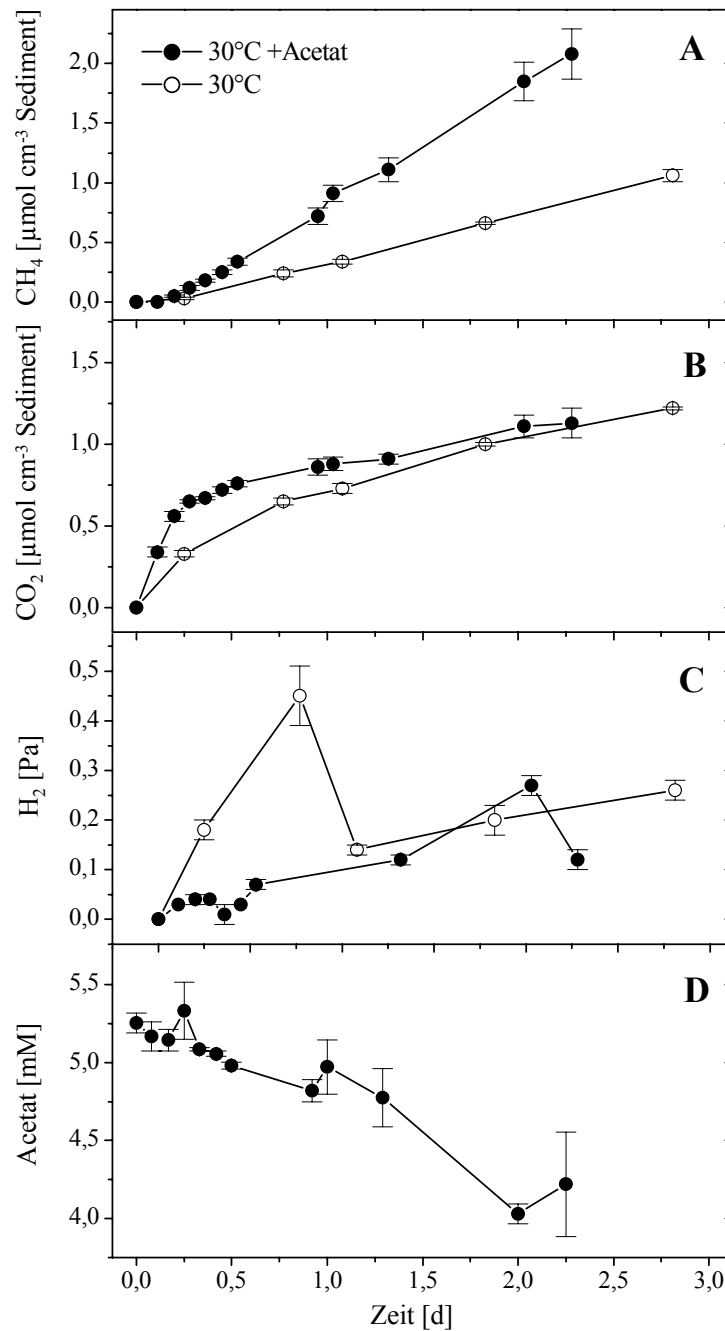


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der CH₄- (A), CO₂- (B) [$\mu\text{mol cm}^{-3}$ Sediment], H₂- [Pa] (C) und Acetat-Konzentrationen (D) während der Inkubation bei 30°C in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Januar 2003. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

2.2.3 Respiratorischer Index (RI) für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat

Die Bestimmung des respiratorischen Index (RI) für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat erfolgte als Sedimentaufschlammungen mit einer Sedimentprobe vom Juli 2003 und mit einer bereits von Nüsslein et al. (2001) untersuchten Sedimentprobe vom Juni 1999 bei *in situ* Temperatur (15°C) und bei 30°C (s. II.7.1.3). Sowohl während der Inkubation bei 15°C als auch während der Inkubation bei 30°C wurde in allen Ansätzen der Sedimentprobe vom Juli 2003 und vom Juni 1999 die ¹⁴C-Markierung der Methylgruppe des Acetats fast ausschließlich im gebildeten Methan wiedergefunden. Nur geringe Mengen des gebildeten Kohlendioxid waren ¹⁴C-markiert. In Abbildung 15 ist als Beispiel die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetats zu ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ der Sedimentprobe vom Juli 2003 bei einer Inkubationstemperatur von 30°C dargestellt.

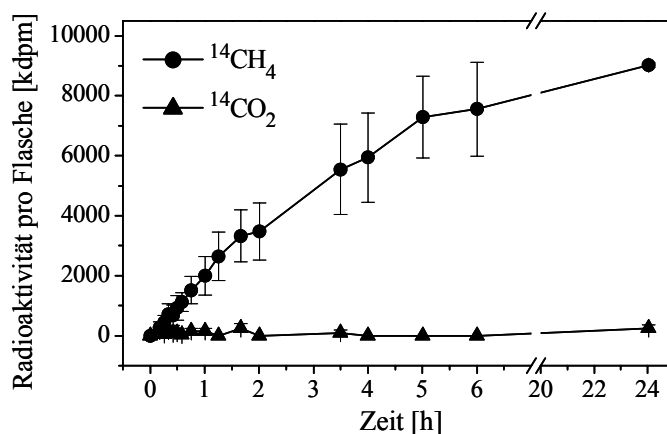


Abbildung 15: Umsatz von [2-¹⁴C]-Acetat zu ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ [kdpm] bei 30°C in Sedimentaufschlammungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2003. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

Die Bestimmung der RI-Werte erfolgte nach vollständiger Umsetzung des [2-¹⁴C]-Acetats und Ansäuerung der Sedimentaufschlammung mit 1 ml H₂SO₄ (1 M) nach der unter II.4.7.4 angegebenen Formel. Für die Sedimentprobe vom Juli 2003 ergab sich nach Inkubation bei der *in situ* Temperatur (15°C) und bei 30°C, ein RI-Wert von $0,17 \pm 0,002$ bzw. $0,17 \pm 0,011$. In den Sedimentaufschlammungen der Sedimentprobe vom Juli 2003 wurden somit 83 % des [2-¹⁴C]-Acetats durch acetoklastische Spaltung zu ¹⁴CH₄ umgesetzt. Die RI-Werte der Sedimentprobe vom Juni 1999 lagen mit $0,31 \pm 0,008$ nach Inkubation bei 15°C und mit $0,32 \pm 0,033$ nach Inkubation bei 30°C über denen des Sediments vom Juli 2003 und über 0,2, dem für die acetoklastische Methanogenese charakteristischen Wert (s. II.7.1.3).

2.2.4 Einfluss von Algenbiomasse auf die Methanproduktion in verschiedenen Sedimenttiefen

In diesem Versuch wurde der Abbau und Einfluss sedimentierender Biomasse (in Form von *Peridinium gatunense*; s. II.7.1.6) auf die Methanproduktion in verschiedenen Tiefen des Profundalsediments unter Verwendung intakter Sedimentkerne vom Oktober 2004 untersucht. Die Sedimentkerne wurden mit und ohne Algenzugabe (Kontrollkern) für sechs Tage bei *in situ* Temperatur von 15°C inkubiert und anschließend in 1 cm (0-4 cm), 2 cm (4-6 cm) und 3 cm (6-12 cm) dicke Schichten geschnitten. Es folgte die Bestimmung der Fettsäurekonzentrationen im Porenwasser der verschiedenen Schichten und mittels Sedimentaufschlämmungen die Bestimmung der Methanproduktionsraten.

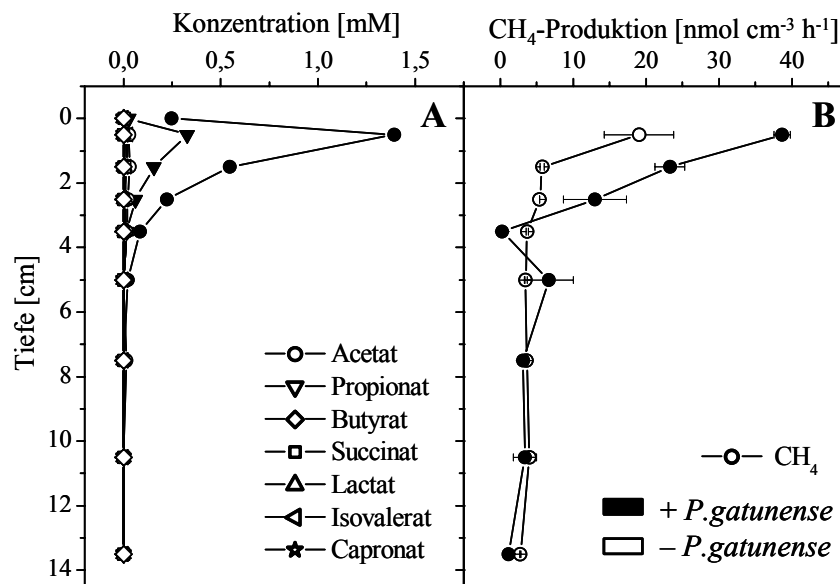


Abbildung 16: Fettsäurekonzentrationen [mM] (A) und CH₄-Produktionsraten [nmol CH₄ cm⁻³ Sediment h⁻¹] (B) in verschiedenen Sedimenttiefen des Profundalsediments von Oktober 2004 nach Zugabe von Algen zu Sedimentkernen und ohne Algenzugabe nach sechstägiger Inkubation bei 15°C. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

Nach sechstägiger Inkubation konnte im Kontrollkern als einzige Fettsäure nur Acetat im Porenwasser der oberen Sedimentschichten detektiert werden (Abbildung 16 A). Die Acetatkonzentration entsprach mit ca. 30 µM der *in situ* Konzentration. In dem mit Algenzugabe inkubierten Sedimentkern wurden Acetat und Propionat, jedoch in weitaus höheren Konzentrationen als im Kontrollkern, detektiert. Die höchsten Konzentrationen beider Fettsäuren wurden innerhalb des ersten Zentimeters des Sedimentkernes ermittelt,

wobei die Acetatkonzentration (1,4 mM) ungefähr 4,5-mal höher als die Propionatkonzentration (0,3 mM) war. Die höchsten Methanproduktionsraten wurden in beiden Ansätzen ebenfalls in den oberen Schichten der Sedimentkerne bestimmt (Abbildung 16 B), in denen auch die höchsten Konzentrationen an Acetat detektiert worden waren. In dieser Sedimentschicht führte die Algenzugabe zu einer Verdoppelung der Methanproduktionsrate von $19,06 \pm 4,77 \text{ nmol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment h}^{-1}$ auf $38,62 \pm 1,15 \text{ nmol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment h}^{-1}$. In dem Ansatz mit Algenzugabe blieben die Methanproduktionsraten ab einer Sedimenttiefe von 4-6 cm und im Kontrollansatz ab einer Tiefe von 6-9 cm konstant bei ca. $3,5 \text{ nmol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sediment h}^{-1}$ und nahmen erst unterhalb von 12 cm weiter ab.

3. Identifizierung der acetatverwertenden mikrobiellen Populationen im Profundalsediment des See Genezareth

In diesem Inkubationsexperiment mit Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments wurde die Stable-Isotope-Probing-Technik angewandt, um Mitglieder der archaeellen und bakteriellen Gemeinschaft des Profundalsediments zu identifizieren, die aktiv an der Umsetzung von Acetat in den anoxischen, methanogenen Sedimentschichten beteiligt sind. Durch die Identifizierung dieser mikrobiellen Populationen, die für die biogeochemischen Prozesse in der Abwesenheit alternativer anorganischer Elektronenakzeptoren, wie die acetoklastische Methanogenese und anaerobe Oxidation von Acetat, verantwortlich sind, sollte dieses Inkubationsexperiment das bisherige Verständnis über den terminalen Schritt des Kohlenstoffkreislaufs in diesem Habitat erweitern.

3.1 Biogeochemische Prozesse nach Zugabe von Acetat

Die Herstellung der Sedimentaufschlämmungen von Sedimentproben vom Juli 2003 wurde so durchgeführt (s. II.7.1.4), dass während der Inkubation Bedingungen herrschten, die die anoxischen, methanogenen Sedimentschichten des Profundalsediments simulierten, d. h. die durch die Abwesenheit anorganischer Elektronenakzeptoren charakterisiert waren.

3.1.1 Anorganische Ionen und organische Säuren

Im Porenwasser der in dieses Inkubationsexperiment eingesetzten Sedimentprobe konnte kein Nitrat nachgewiesen werden und die Sulfatkonzentration lag unter 100 μM .

Vor und während der Inkubation war Acetat die einzige detektierbare Fettsäure in den Sedimentaufschlämmungen. Die Acetatkonzentrationen des Sediments lagen vor dem Inkubationsstart bei ca. 25 μM . Während der Inkubationsdauer von 18 Tagen wurde Acetat insgesamt fünfmal zu den Ansätzen hinzugefügt (jeweils in einer Endkonzentration von 5,5 mM). Insgesamt entsprach dies einer Stoffmenge von ungefähr 275 μmol Acetat, die während der Inkubation über 18 Tage in jede Sedimentaufschlämmung zugesetzt worden war. Zu Beginn der Inkubation wurde das Acetat langsam umgesetzt und war erst nach sieben Tagen verbraucht. Ab Tag 7 beschleunigte sich der Acetatumsatz jedoch mit jeder erneuten Acetatzugabe (Abbildung 17).

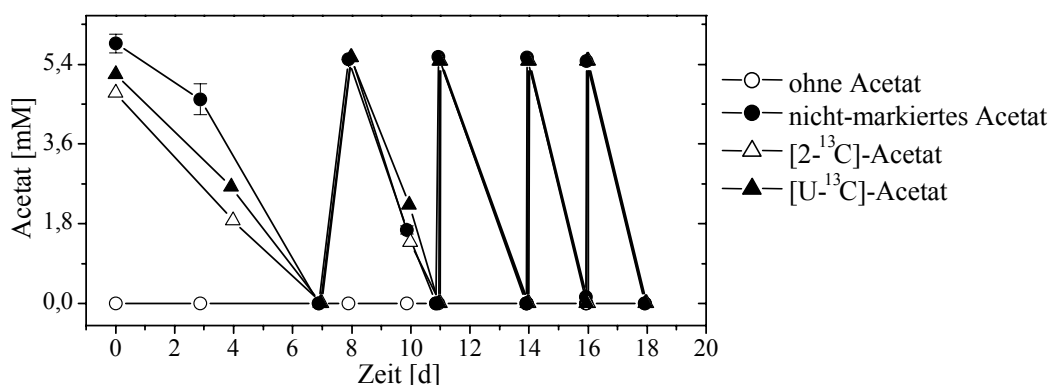


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Acetat-Konzentrationen [mM] während der Inkubation bei 30°C ohne Zugabe von Acetat und nach Zugabe von nicht-markiertem Acetat, [2-¹³C]-Acetat und [U-¹³C]-Acetat zu Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2003.

3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentration

In Abbildung 18 sind die Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentrationen über die Dauer der Inkubation dargestellt. Die Methanproduktion begann direkt mit dem Start der Inkubation. Die Methankonzentration stieg dann fast linear mit der Zeit an (Abbildung 18 A). Die Gesamtmethanakkumulation in den Sedimentaufschlämmungen mit Acetatzugabe belief sich auf ca. 287 μmol . Bezieht man die Methanproduktion (22 μmol Methan) der Kontrollinkubationen ohne Acetatzugabe in die Bilanzierung mit ein, wurden ca. 265 μmol Methan aus dem hinzugefügten Acetat produziert, was einer Wiederfindung von 96 % entspricht. Da das Profundalsediment aus einem hohen Anteil an CaCO_3 (ca.

50 %) besteht (Serruya, 1971), reflektierte der während der Inkubation gemessene Anstieg des CO_2 (g+aq) nicht die von der Acetatumsetzung erwartete Stöchiometrie (Abbildung 18 B). Die Wasserstoffpartialdrücke waren über die ganze Dauer der Inkubation sehr niedrig (Abbildung 18 C). Der Wasserstoffpartialdruck stieg in allen Inkubationen bis Tag 4 auf ca. 0,75 Pa an. Bis Tag 7 nahm der Wasserstoffpartialdruck dann wieder bis auf ca. 0,2 Pa ab und blieb anschließend in den Inkubationen mit Acetatzugabe relativ konstant, während er in den Kontrollinkubationen wieder leicht anstieg.

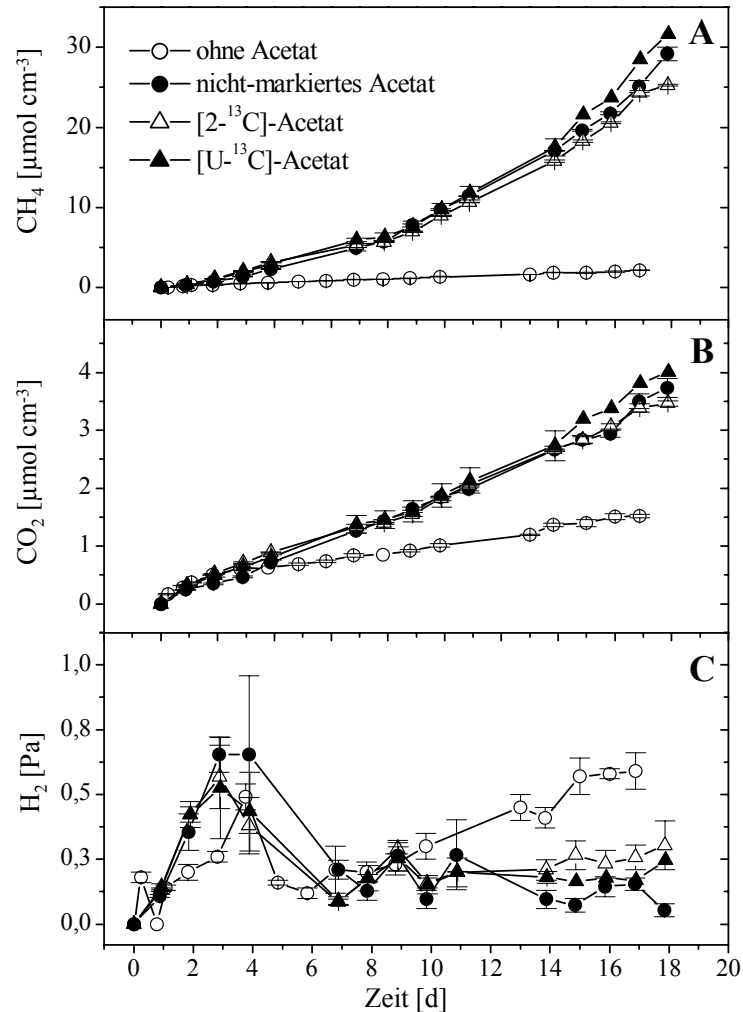


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der CH_4 - (A), CO_2 - (B) [$\mu\text{mol cm}^{-3}$ Sedimentaufschlammung], H_2 -Konzentrationen [Pa] (C) während der Inkubation bei 30°C ohne Zugabe von Acetat und nach Zugabe von nicht-markiertem Acetat, [2- ^{13}C]-Acetat und [U- ^{13}C]-Acetat zu Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2003. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

3.1.3 Zeitlicher Verlauf der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid (Umsatz von $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat zu $^{13}\text{CH}_4$ und $^{13}\text{CO}_2$)

Um Informationen über den Abbauweg des Acetats und die Wege der Methanbildung in den Sedimentaufschlämmungen zu erhalten, wurde ein Ansatz von Sedimentaufschlämmungen mit $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat inkubiert (s. II.7.1.4) und das gebildete Methan und Kohlendioxid mittels GC-C-IRMS analysiert (Abbildung 19). Direkt mit Beginn der Inkubation waren 85 % des gebildeten Methans ^{13}C -markiert (Abbildung 19 A). Dieser hohe Anteil an $^{13}\text{CH}_4$ blieb bis Ende der Inkubation konstant. Nur etwa 4 % des gebildeten Kohlendioxids waren ^{13}C -markiert. Dies deutete darauf hin, dass nur ein geringer Anteil der Methylgruppe des $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetats zu Kohlendioxid oxidiert worden war (Abbildung 19 A). Dieser Anteil an gebildetem $^{13}\text{CO}_2$ kann jedoch durch den hohen Anteil an CaCO_3 im Sediment unterschätzt worden sein, da nicht auszuschließen ist, dass es durch die Gleichgewichts-isotopeneffekte zwischen CaCO_3 , $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ und $\text{CO}_{2(\text{g})}$ zu einer Anreicherung des ^{13}C im CaCO_3 und des ^{12}C im $\text{CO}_{2(\text{g})}$ kommen konnte.

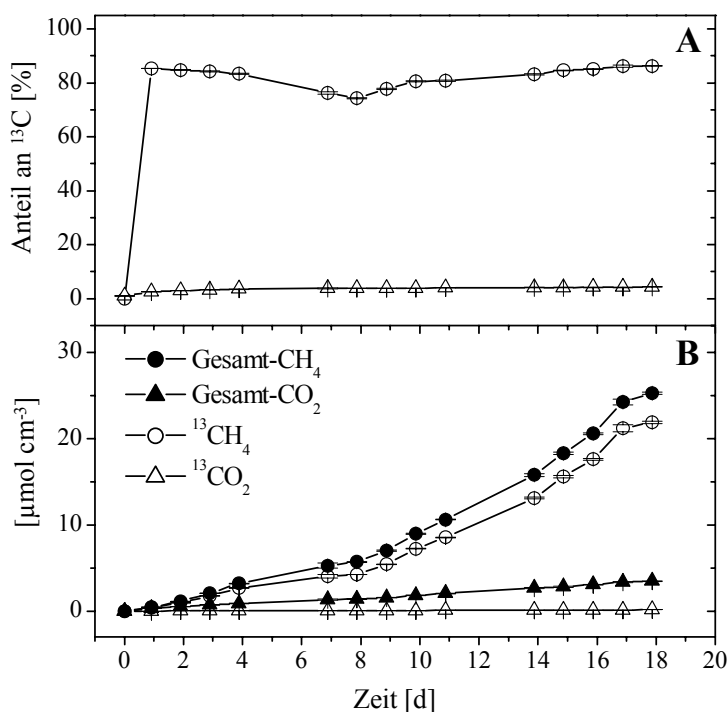


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf des Anteils an gebildetem $^{13}\text{CH}_4$ und $^{13}\text{CO}_2$ (A) und Konzentrationen des Gesamt- CH_4 - und $-\text{CO}_2$ [$\mu\text{mol cm}^{-3}$ Sedimentaufschlämmung] im Vergleich zu Konzentrationen des ^{13}C -markierten Anteils (B) während der Inkubation bei 30°C nach Zugabe von $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2003. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

3.2 Aktiv acetatverwertende mikrobielle Populationen – RNA-SIP

Zur Identifizierung aktiv acetatverwertender *Bacteria* und *Archaea* im Profundalsediment des See Genezareth wurde die Stable-Isotope-Probing-Technik basierend auf 16S rRNA (RNA-SIP) herangezogen. Nach einer Inkubationszeit von null, zehn und 18 Tagen erfolgte die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) aus den mit [U- ^{13}C]-Acetat inkubierten Sedimentaufschlämmungen. Die RNA wurde mit Hilfe der CsTFA-Dichtegradientenzentrifugation, je nach Grad ihrer ^{13}C -Markierung, im Gradienten angeordnet. Anschließend erfolgte die Aliquotierung des Gradienten in einzelne Fraktionen.

3.2.1 Verteilung der Nukleinsäure im Gradienten

Die Verteilung der bakteriellen und archaeellen 16S rRNA-Moleküle in den einzelnen gesammelten Gradientenfraktionen nach zehn und 18 Tagen Inkubation mit [U- ^{13}C]-Acetat wurde mittels quantitativer „real-time“ RT-PCR mit domänespezifischen Primern bestimmt. Die Ergebnisse der RNA-Quantifizierungen in den einzelnen Fraktionen von Tag 10 und 18 sind in Abbildung 20 dargestellt. Nach zehn Tagen Inkubation wurde der Hauptanteil der bakteriellen 16S rRNA-Moleküle in Fraktionen mit einer Dichte von 1,77 bis 1,80 g ml $^{-1}$ CsTFA (Lueders et al., 2004a; Lueders et al., 2004c) wiedergefunden. Diese Dichten sind charakteristisch für nicht-markierte „leichte“ Nukleinsäuren. Es wurde nur eine sehr kleine Schulter von „schwerer“ bakterieller 16S rRNA oberhalb einer Dichte von 1,80 g ml $^{-1}$ CsTFA detektiert (Abbildung 20 A). Ein Teil der archaeellen 16S rRNA war jedoch in Richtung der „schweren“ Fraktionen mit höherer Dichte (über 1,81 g ml $^{-1}$ CsTFA) gewandert (Abbildung 20 A). Nach zehn Tagen Inkubation entsprach die Summe der archaeellen 16S rRNA-Moleküle in den Fraktionen ungefähr 55 % der bakteriellen 16S rRNA-Moleküle. Obwohl sich nach 18 Tagen Inkubation der größte Teil der bakteriellen 16S rRNA noch immer in den „leichten“ Fraktionen befand, konnte man eine leichte Verschiebung der Schulter in Richtung der „schwereren“ Fraktionen erkennen (Abbildung 20 B). Nach 18 Tagen Inkubation wurden jedoch in der Summe weniger bakterielle 16S rRNA-Moleküle als nach zehn Tagen detektiert. Im Gegensatz zu der bakteriellen 16S rRNA, war nach 18 Tagen Inkubation fast die gesamte archaeelle 16S rRNA in die „schweren“ Fraktionen, mit einer Dichte von 1,80 bis 1,83 g ml $^{-1}$ CsTFA, gewandert (Abbildung 20 B). Des Weiteren war eine Stimulierung der archaeellen Gemeinschaft offensichtlich, da die Summe der detektierten archaeellen 16S rRNA-

Moleküle die der nach zehn Tagen ermittelten überschritten hatte und nach 18 Tagen sogar ungefähr der Summe der bakteriellen 16S rRNA-Moleküle entsprach.

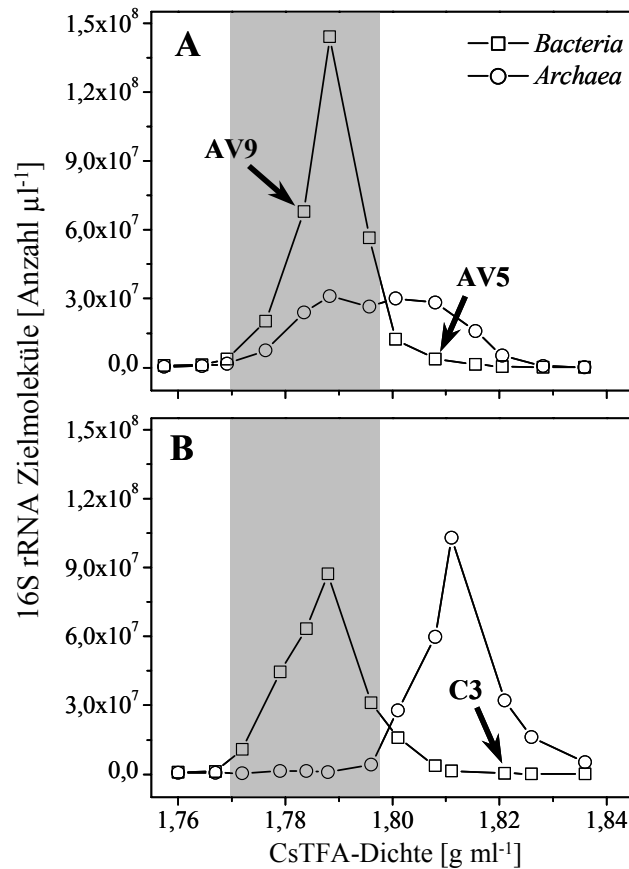


Abbildung 20: CsTFA-Dichtegradientenzentrifugation der aus zehn (A) und 18 (B) Tagen mit [U-¹³C]-Acetat inkubierten Sedimentaufschlammungen extrahierten rRNA. Die Verteilung der domänenspezifischen Zielmoleküle (bakterielle und archaeelle 16S rRNA) in den Gradientenfractionen wurde mit Hilfe quantitativer „real-time“-RT-PCR bestimmt. Der für „leichte“ rRNA charakteristische Dichtebereich ist grau unterlegt. Die mit einem Pfeil markierten Fractionen wurden für Klonbibliotheken verwendet.

3.2.2 Struktur der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten mikrobiellen Populationen

Um die durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten, ¹³C-markierten bzw. nicht-markierten, archaeellen bzw. bakteriellen Populationen miteinander vergleichen zu können, wurde von allen nach null-, zehn- und 18-tägiger Inkubation Fractionen eine 16S rRNA-basierte T-RFLP-Analyse durchgeführt (s. Abbildung 21-24). Zum Zeitpunkt Null (Tag 0) zeigen sowohl die archaeellen als auch die bakteriellen T-RFLP-Profile der einzelnen Fractionen sehr große Ähnlichkeit zueinander (Abbildung 21 und 24). Die

archaeellen T-RFLP-Muster der Fraktionen (A11–A5) zeigten drei Haupt-T-RFs mit einer Länge von 284, 392 und >700 bp (Abbildung 21). Das T-RF der Länge 284 bp trat in allen T-RFLP-Profilen mit der größten Abundanz auf. Aufgrund der geringen Anzahl vorhandener archaeeller 16S rRNA-Moleküle in den beiden „schweren“ Fraktionen A4 (1,808 g ml⁻¹ CsTFA) und A3 (1,816 g ml⁻¹ CsTFA) war es nicht möglich, ein RT-PCR-Produkt dieser beiden Fraktionen für die T-RFLP-Analyse zu amplifizieren. Nach zehn- und 18-tägiger Inkubation änderten sich sowohl die archaeellen T-RFLP-Muster der „leichten“ als auch der „schweren“ Fraktionen (Abbildung 22 und 23). Dies deutete auf eine sehr aktive, acetatverwertende archaeelle Gemeinschaft hin. In den „schweren“ Fraktionen wurde ausschließlich das 284-bp-T-RF detektiert. Auch die T-RFLP-Profile der „leichten“ Fraktionen wurden nach zehn und 18 Tagen Inkubation von dem 284-bp-T-RF dominiert, während die T-RFs der Länge 392 bp und >700 bp fast vollständig verschwunden waren.

Zum Vergleich der relativen Häufigkeiten bakterieller T-RFs in allen bakteriellen T-RFLP-Muster nach null, zehn und 18 Tagen Inkubation wurde eine Standardisierung der Gesamtsignalintensitäten der T-RFLP-Muster von der „Gesamtgemeinschaft“ vor der Dichtegradientenzentrifugation und von den einzelnen Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (s. II.5.7.3). Zum Zeitpunkt Null (Tag 0) zeigten die bakteriellen T-RFLP-Muster der „leichten“ und „schweren“ Fraktionen nach der Standardisierung zehn Haupt-T-RFs mit einer Abundanz von jeweils mindestens 4 % (Abbildung 24). Nach zehntägiger Inkubation ähnelten die T-RFLP-Profile der „leichten“ Fraktionen stark denen von Tag 0. Es wurden die gleichen T-RFs jedoch zum Teil mit geringen Unterschieden in ihrer Abundanz detektiert. Obwohl nach zehn Tagen Inkubation nur eine geringe Anzahl bakterieller 16S rRNA-Molekülen in den „schweren“ Fraktionen detektiert werden konnte, hatte sich die bakterielle Population dieser Fraktionen im Vergleich zu dem Zustand vor der Inkubation vollständig geändert. Ein T-RF der Länge 231 bp wurde sehr dominant und T-RFs der Länge 218, 220, 222, 224, und 238 bp wurden zusätzlich detektiert. Nach 18-tägiger Inkubation hatte sich die bakterielle Population in den „leichten“ Fraktionen in ihrer Zusammensetzung noch immer kaum verändert, wohingegen in den „schweren“ Fraktionen die relative Häufigkeit der T-RFs der Länge 218, 220, 222, und 224 bp abnahm oder diese sogar ganz verschwanden. Zusätzlich wurden drei weitere T-RFs der Länge 204, 214, und 303 bp in den „schweren“ Fraktionen erfasst und die bereits nach zehntägiger Inkubation detektierte Dominanz des 231-bp- und 238-bp-T-RFs nahm nach 18 Tagen weiter zu.

III. Ergebnisse

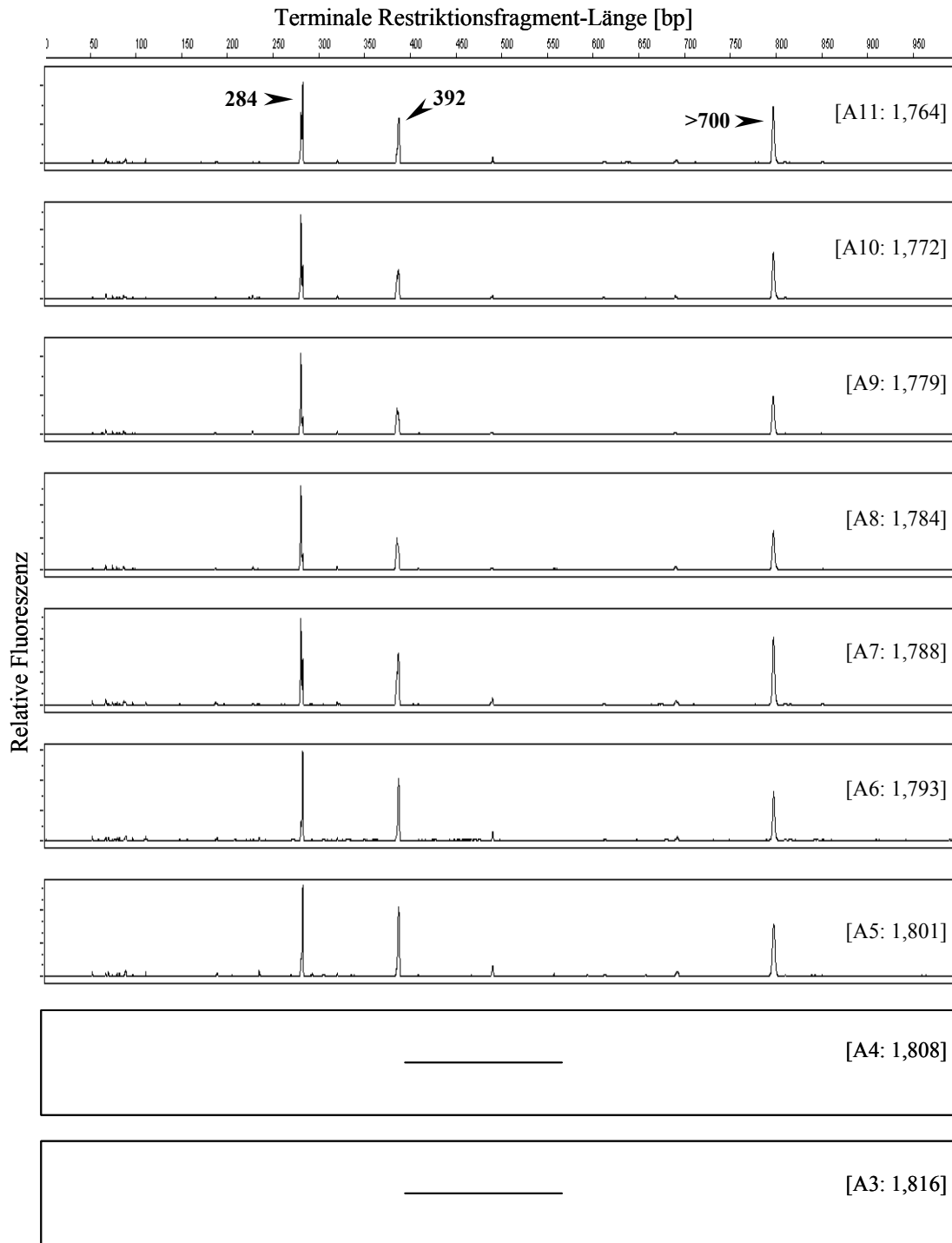


Abbildung 21: T-RFLP-Muster der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten archaeellen Gemeinschaft von „leichten“ und „schweren“ rRNA Gradientenfraktionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach null Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

III. Ergebnisse

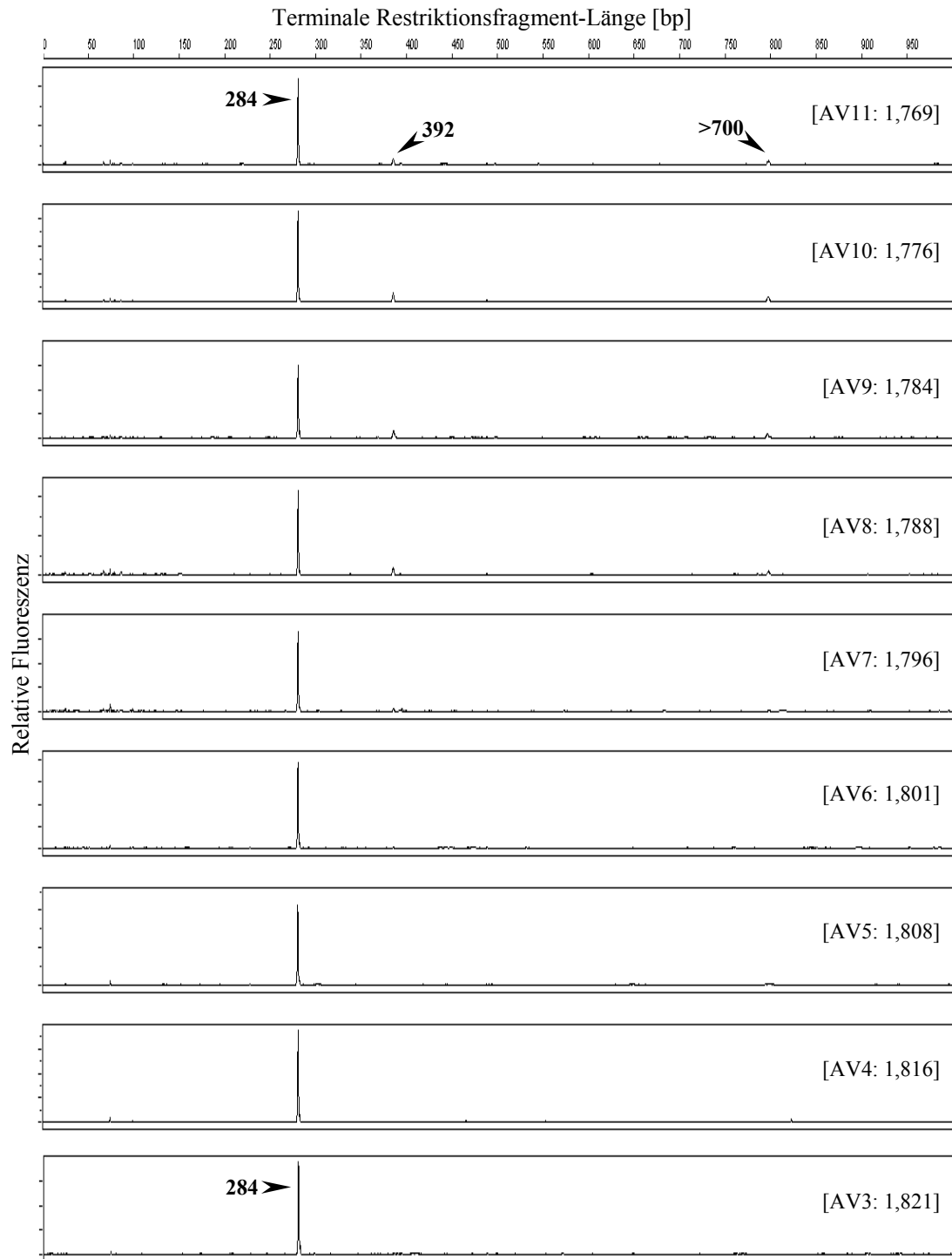


Abbildung 22: T-RFLP-Muster der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten archaeellen Gemeinschaft von „leichten“ und „schweren“ rRNA Gradientenfraktionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach zehn Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

III. Ergebnisse

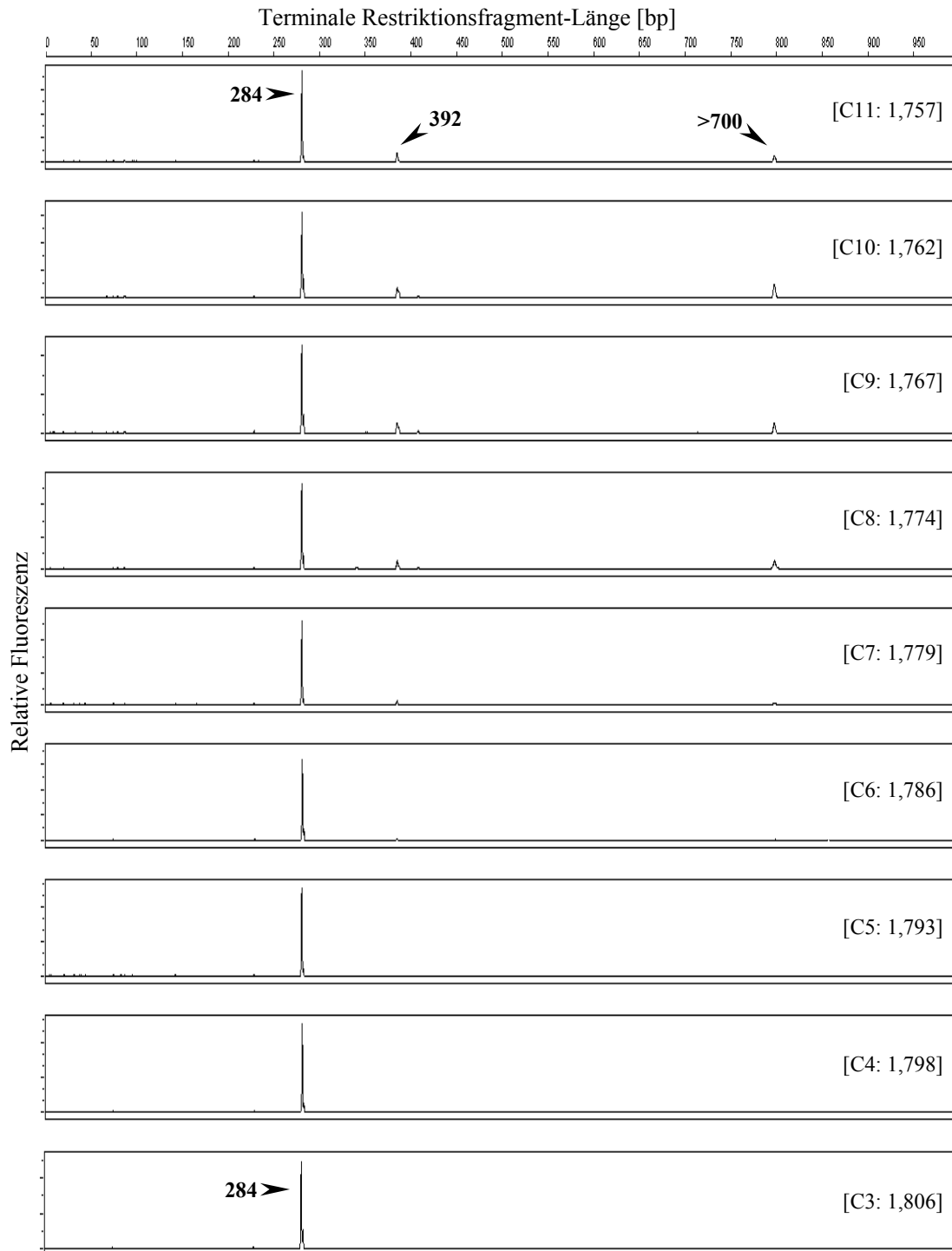


Abbildung 23: T-RFLP-Muster der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten archaeellen Gemeinschaft von „leichten“ und „schweren“ rRNA Gradientenfractionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach 18 Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fractionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

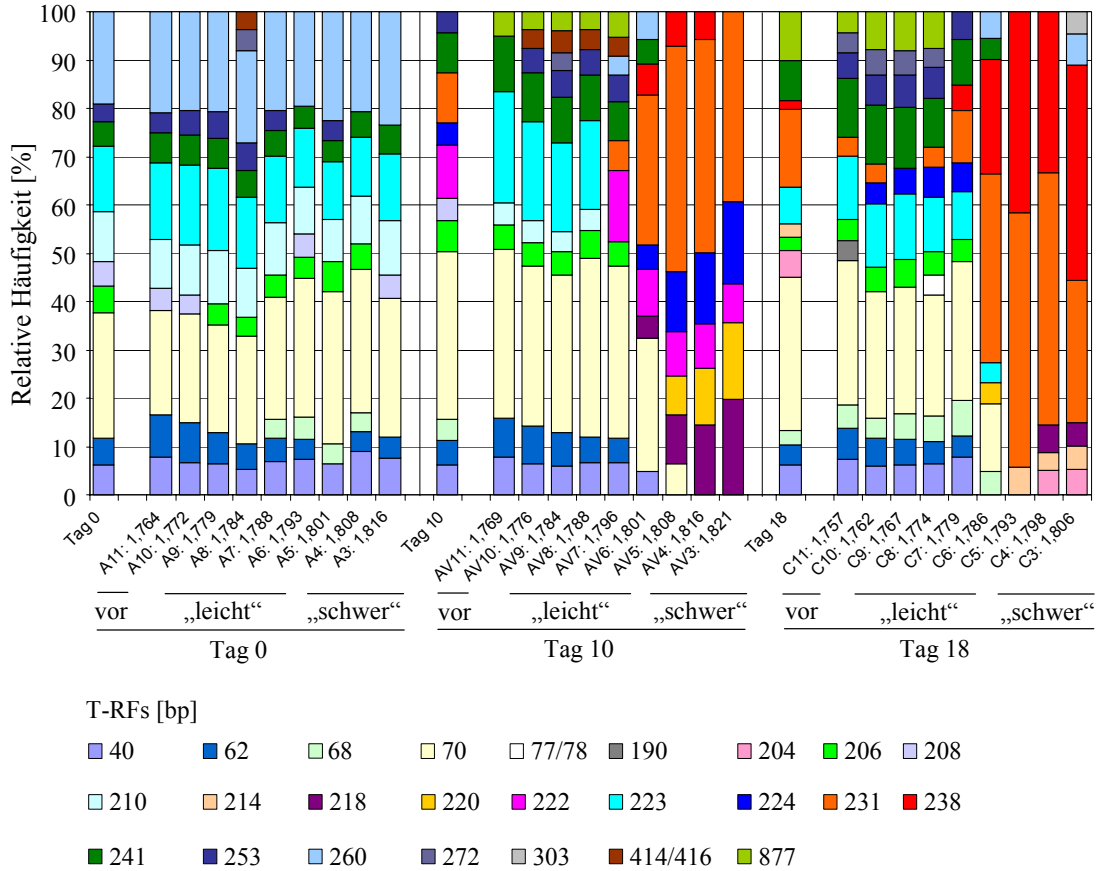


Abbildung 24: Relative Häufigkeiten bakterieller 16S rRNA-Fragmente (16S rcDNA) in Sedimentaufschlammungen des Profundalsediment vor (Tag 0) und nach Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat (Tag 10 und 18). Dargestellt sind die T-RFLP-Muster der nicht aufgetrennten bakteriellen Gemeinschaft („vor“) und der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten bakteriellen Gemeinschaft der rRNA-Gradientenfraktionen nach reverser Transkription und Restriktion mit *Hae*III. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. Die Bezeichnungen „leicht“ und „schwer“ beziehen sich auf die ¹³C-Anreicherung der mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten rRNA.

3.2.3 Phylogenetische Analyse der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten mikrobiellen Populationen

Mit Hilfe der unter III.1.1 beschriebenen Klonbibliotheken, die für archaeelle 16S rRNA-Gene und revers-transkribierte 16S rRNA aus dem Profundalsediment erzeugt worden waren, konnten alle in den verschiedenen Gradientenfraktionen detektierten archaeellen T-RFs definierten archaeellen Taxa zugeordnet werden. Das 392-bp-T-RF konnte den hydrogenotrophen *Methanomicrobiaceae* und *Methanospirillaceae*, sowie der nicht-methanogenen „Group III“ (*Thermoplasma* und deren Verwandten) innerhalb der *Euryarchaeota* (Jurgens et al., 2000) zugeordnet werden. Der >700-bp-T-RF repräsentierte ebenfalls die „Group III“ der *Euryarchaeota*. Das dominante T-RF der Länge 284 bp wurde den acetoklastischen *Methanosaetaceae* mit *Methanosaeta concilii* als nächstem Verwandten zugeordnet.

Zur Identifizierung der in den verschiedenen Gradientenfraktionen vorhandenen, bakteriellen 16S rRNA, und für die Zuordnung charakteristischer T-RFs zu definierten bakteriellen Taxa, wurden drei Klonbibliotheken erzeugt und wie unter II.5.8.4 beschrieben analysiert. Eine Klonbibliothek wurde von revers-transkribierter 16S rRNA einer „leichten“ Fraktion (AV9; n=73) des Tag-10-Gradienten hergestellt, zwei weitere Klonbibliotheken von zwei „schweren“ Fraktionen (AV5; n=75 und C3; n=57) von den Gradienten der 10- und 18-Tage-Inkubationen. Diese Fraktionen sind in Abbildung 20 mit einem Pfeil markiert. Die phylogenetische Analyse der „leichten“ Klonsequenzen offenbarte eine sehr diverse bakterielle Gemeinschaft. Die phylogenetische Einordnung dieser Klonsequenzen (AV9) und deren charakteristische T-RFs sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die Klonbibliotheken der „schweren“ Fraktionen AV5 und C3 besaßen eine komplett andere Zusammensetzung als die der „leichten“ Fraktion AV9 (s. Tabelle 28). Nach zehn Tagen Inkubation mit [¹³C]-Acetat, wurden die bakteriellen Populationen der „schweren“ Fraktionen von 16S rRNA dominiert, die den *Betaproteobacteria* (T-RF der Länge 218, 220, 222, 224 bp) und dem *Nitrospira*-Phylum (231-bp-T-RF) zugeordnet wurden (Tabelle 28 und Abbildung 24). Das T-RF der Länge 238 bp konnte keiner der Klonsequenzen als charakteristische terminale *HaeIII*-Restriktionsschnittstelle zugewiesen werden. Die zusätzliche *in silico* Bestimmung potentieller sekundärer *HaeIII*-Restriktionsschnittstellen innerhalb der Klonsequenzen deutete jedoch darauf hin, dass das 238-bp-T-RF die zweite *HaeIII*-Restriktionsschnittstelle und damit charakteristisch für alle *Nitrospira*-verwandten Klonsequenzen war. Diese sekundäre Restriktionsschnittstelle

verursachte in allen bakteriellen T-RFLP-Profilen, in denen *Nitrospira* mit hoher relativer Abundanz detektiert worden war, ein sogenanntes Pseudo-T-RF (Egert und Friedrich, 2003) mit einer Länge von 238 bp. Die „schweren“ *Betaproteobacteria*- und *Nitrospira*-verwandten Klonsequenzen sind in Abbildung 25 und 26 zusammen mit anderen bereits in öffentlichen Datenbanken erhältlichen Umweltsequenzen und Sequenzen von Isolaten sowie deren Habitate in phylogenetischen Dendrogrammen dargestellt. Da eine enge Verwandtschaft von Sequenzen aus dem Profundalsediment des See Genezareth zu Sequenzen anderer Habitate auf eine Selektion von Mikroorganismen durch ähnliche Umweltbedingungen zurückzuführen sein könnte, lassen sich eventuell von diesen Habitaten Rückschlüsse auf die Umweltbedingungen im Profundalsediment des See Genezareth schließen. Die zu den *Betaproteobacteria* verwandten Klonsequenzen wurden von Sequenzen dominiert, die den Ordnungen der *Rhodocyclales* (218-bp-T-RF) und der *Nitrosomonadales* (224-bp-T-RF) zugeordnet worden waren (Abbildung 25). Die *Nitrospira*-verwandten Klonsequenzen waren am nächsten mit zwei Umweltsequenzen aus einem leicht saurem durch Pinien-dominierten Wald-Feuchtgebiet (93 % Sequenzidentität; Brofft et al., 2002) und aus der Kontinentalkruste (91 % Sequenzidentität; Lin et al., unveröffentlicht) verwandt (Abbildung 26). Die am nächsten verwandten Kultivierten waren „*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*“ (87 % Sequenzidentität) und *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (88 % Sequenzidentität). Die T-RFs der Länge 204 und 303 bp, die erst nach 18 Tagen Inkubation auftraten, konnten dem Candidatus Phylum „*Endomicrobia*“ (Sequenzidentität von 89-90 %) bzw. den *Firmicutes* (*Clostridiales*) zugeordnet werden. Innerhalb der bakteriellen Klonbibliotheken aus „schweren“ 16S rRNA wurden ebenfalls einige Sequenzen detektiert (charakteristisches T-RF von 214 bp Länge), die am nächsten verwandt zu den *Euryarchaeota* (*Methanosaeta*) waren. Diese Erfassung archaeeller 16S rRNA-Zielmoleküle trotz des *Bacteria*-spezifischen PCR-Assays wurde höchstwahrscheinlich durch eine vergleichsweise hohe Anzahl archaeeller 16S rRNA-Targetmoleküle im Vergleich zu denen bakterieller 16S rRNA in diesen Gradientenfraktionen verursacht (Abbildung 7). Tatsächlich ergab die *in silico* Bestimmung der *TaqI*-Restriktionsschnittstelle dieser Klonsequenzen ein T-RF der Länge 284 bp, das charakteristisch für *Methanosaeta* spp. ist.

III. Ergebnisse

Tabelle 28: Zuordnung von 16S rcDNA-Klonsequenzen aus Klonbibliotheken von Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennter, bakterieller 16S rRNA nach zehn und 18 Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Bacteria* und ihre Zuordnung zu T-RFs nach Restriktion mit *Hae*III.

Phylogenetische Gruppe	Tag 10 „leicht“ AV9 ^a		Tag 10 „schwer“ AV5 ^a		Tag 18 „schwer“ C3 ^a	
	Anzahl Klone	T-RF [bp]	Anzahl Klone	T-RF [bp]	Anzahl Klone	T-RF [bp]
<i>Acidobacteria</i>	3	68*, 77*, 217*	1	68*		
<i>Actinobacteria</i>						
<i>Actinomycetales</i>	3	219*, 220*, 227				
C. „ <i>Microthrix</i> “	1	237				
<i>Bacteroidetes</i>	4	40*, 253, 260, 910				
<i>Chloroflexi</i>	13	62, 217*, 219*, 221*, 223, 224*, 225, 230, 414	4	64, 68*, 226, 303*	1	221*
<i>Cyanobacteria</i>	1	63				
<i>Deferribacteres</i>	3	266, 241*, 158				
<i>Firmicutes</i>						
<i>Clostridiales</i>	1	299	3	301, 257	1	303*
<i>Nitrospira</i>			30	231, [238]	33	231, [238]
<i>Planctomycetes</i>	3	68*, 241*, 416	1	70*		
<i>Verrucomicrobia</i>	2	234, 244*			1	224*
<i>Betaproteobacteria</i>						
<i>Burkholderiales</i>	3	198, 219*, 221*	3	218, 320	1	199
<i>Hydrogenophilales</i>	2	70*	3	70*, 220*		
<i>Methylophilales</i>	1	201	1	222		
<i>Nitrosomonadales</i>	1	222	7	220*, 222, 224*	1	224*
<i>Rhodocyclales</i>	1	70*	8	218, 220		
<i>Gammaproteobacteria</i>						
<i>Methylococcales</i>	11	70*, 78	3	70*, 252	1	70*
C. „ <i>Competibacter</i> “	3	112, 191, 284				
nicht klassifiziert	1	40*				
<i>Deltaproteobacteria</i>						
<i>Desulfobacterales</i>	5	189, 204*, 210	5	210, 274, 276		
<i>Desulfuromonadales</i>			1	207		
<i>Myxococcales</i>	2	206*, 208	1	77*		
<i>Syntrophobacterales</i>	2	204*, 208	1	249		
nicht klassifiziert	1	244*				
<i>Epsilonproteobacteria</i>	1	897				
candidate division WS3	1	206*				
C. „ <i>Endomicrobia</i> “					5	204*
unbekannte Zuordnung	5	70*, 206*, 216				
<i>Euryarchaeota</i>						
<i>Methanosarcinales</i>			1	214 (<i>Taq</i> I: 284)	12	214 (<i>Taq</i> I: 284)

Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. T-RFs mit einem relativen Anteil von mehr als 4 % innerhalb eines T-RFLP-Musters (s. Abbildung 24) sind „fett“ dargestellt. Die mit einem Stern „*“ gekennzeichneten T-RFs wurden in mehr als einer phylogenetischen Gruppe detektiert. Nähere Informationen zu T-RFs in Klammern „[]“ und „()“ sind im Text zu finden. C.: Candidatus.

^a Die Bezeichnungen „leicht“ und „schwer“ beziehen sich auf die ¹³C-Anreicherung der mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten rRNA.

III. Ergebnisse

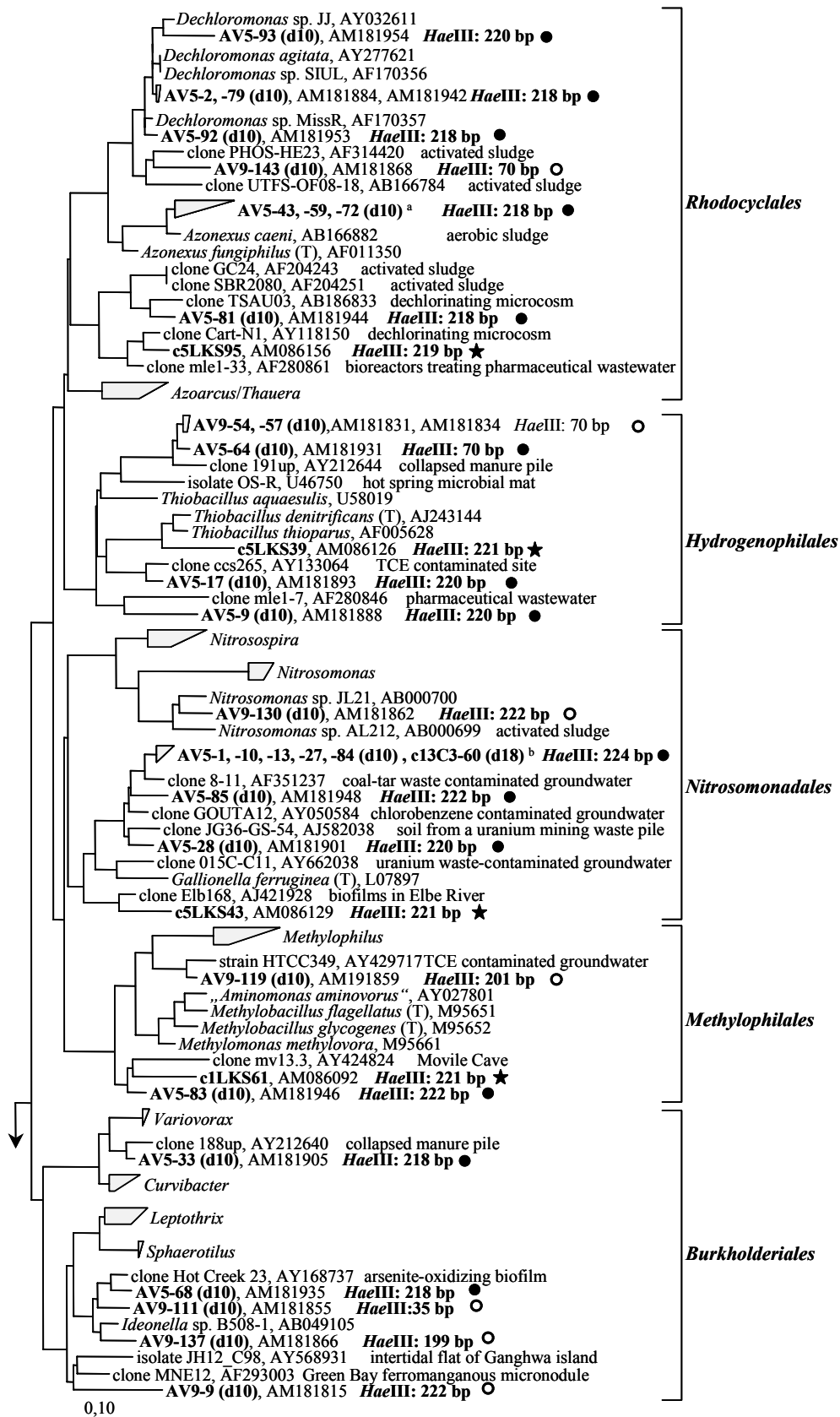


Abbildung 25: Phylogenetische Zuordnung repräsentativer 16S rDNA-Klonsequenzen der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten rRNA-Extrakte des mit [U-¹³C]-Acetat inkubierten

III. Ergebnisse

Profundalsediments des See Genezareth zu den *Betaproteobacteria*. Klonsequenzen, die aus den „schweren“ Fraktionen AV5 und C3 gewonnen wurden, sind mit einem gefüllten Kreis „●“ und Klonsequenzen, die aus der „leichten“ Fraktion AV9 gewonnen wurden, sind mit einem offenen Kreis „○“ markiert. Die mit einem Stern „★“ markierten Klonsequenzen stammen aus den 16S rRNA-Gen-basierenden Klonbibliotheken c1LKS und c5LKS des nicht inkubierten Sediments (s. Anhang A; Tabelle 32). Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Neighbor-Joining Methode unter Ausschluss der hochvariablen Regionen mit einem mit der ARB-Software für die *Betaproteobacteria* bereitgestellten Filter (50 % Invarianz) durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die Längen der zugehörigen T-RFs in [bp] resultieren aus *in silico* Restriktion der klonalen 16S rcDNA-Sequenzen mit *HaeIII*. Die „Accession numbers“ sind angegeben.

^a „Accession number“: AM181914, AM181927, AM181938.

^b „Accession number“: AM181883, AM181889, AM181892, AM181900, AM181947; AM181991.

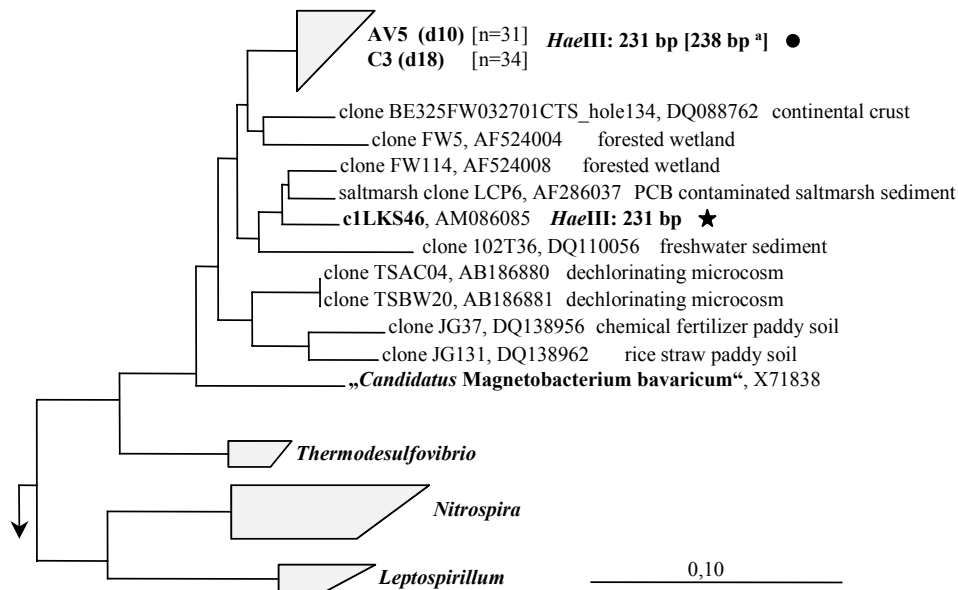


Abbildung 26: Phylogenetische Zuordnung repräsentativer 16S rcDNA-Klonsequenzen der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten rRNA-Extrakte des mit [U-¹³C]-Acetat inkubierten Profundalsediments des See Genezareth zum *Nitrospira*-Phylum. Klonsequenzen, die aus den „schweren“ Fraktionen AV5 und C3 gewonnen wurden, sind mit einem gefüllten Kreis „●“ markiert. Die mit einem Stern „★“ markierte Klonsequenz stammt aus der 16S rRNA-Gen-basierenden Klonbibliothek c1LKS des nicht inkubierten Sediments (s. Anhang A; Tabelle 32). Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Neighbor-Joining Methode unter Ausschluss der hochvariablen Regionen mit einem mit der ARB-Software für die Domäne der *Bacteria* bereitgestellten Filter (50 % Invarianz) durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die Längen der zugehörigen T-RFs in [bp] resultieren aus *in silico* Restriktion der klonalen 16S rcDNA-Sequenzen mit *HaeIII*. Die „Accession numbers“ sind angegeben.

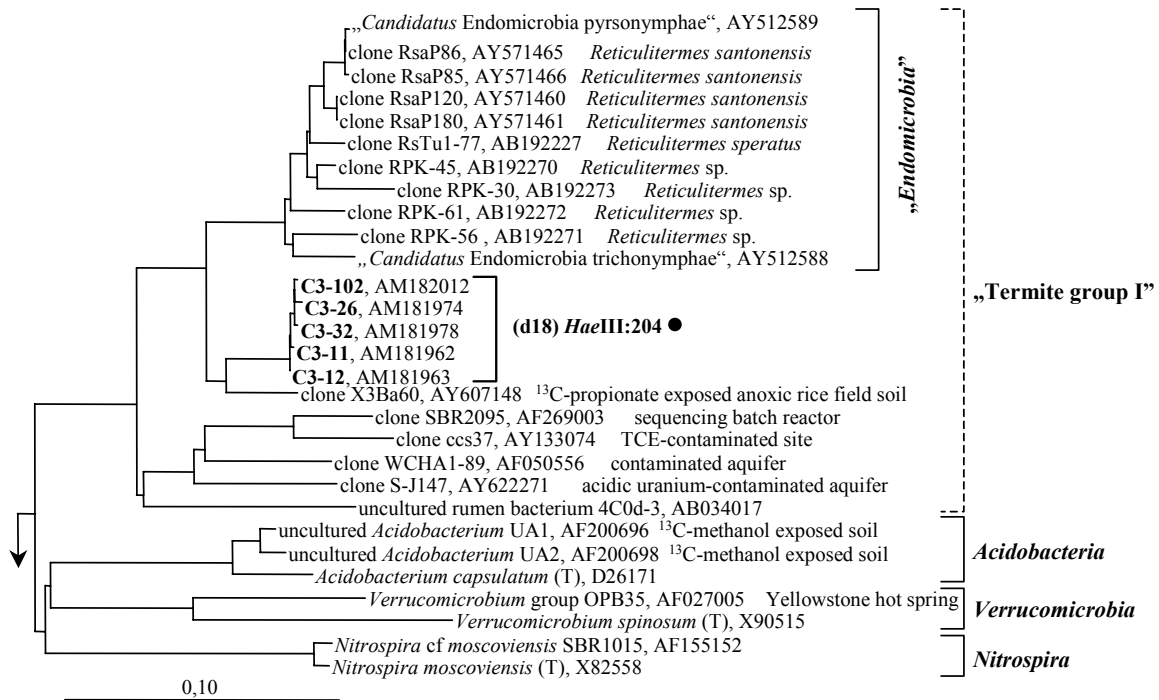


Abbildung 27: Phylogenetische Zuordnung repräsentativer 16S rcDNA-Klonsequenzen der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten rRNA-Extrakte des mit [U-¹³C]-Acetat inkubierten Profundalsediments des See Genezareth zum kürzlich beschriebenen Candidatus Phylum „Endomicrobia“ (zuvor zugehörig zum Candidatus Phylum „Termite group I“; angedeutet durch „---“; nähere Erklärung ist im Text unter IV.3 zu finden). Klonsequenzen, die aus der „schweren“ Fraktion C3 gewonnen wurden, sind mit einem gefüllten Kreis „●“ markiert. Die Berechnungen des Dendrogramms wurden mit der Neighbor-Joining Methode unter Ausschluss der hochvariablen Regionen mit einem mit der ARB-Software für die Domäne der Bacteria bereitgestellten Filter (50 % Invarianz) durchgeführt. Die Topologie des Dendrogramms wurde durch weitere phylogenetische Berechnungsmethoden, d. h. FastDNAML (Ludwig et al., 2004) und TREE-PUZZLE (Schmidt et al., 2002) bestätigt. Der Maßstab entspricht 10 % Sequenzunterschied. Die Längen der zugehörigen T-RFs in [bp] resultieren aus *in silico* Restriktion der klonalen 16S rcDNA-Sequenzen mit *Hae*III. Die „Accession numbers“ sind angegeben.

4. Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse in das Profundalsediment des See Genezareth

In diesem Inkubationsexperiment mit Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments wurde mittels vergleichender, 16S rRNA-basierter T-RFLP-Analyse und der Stable-Isotope-Probing-Technik die Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Biomasse (repräsentiert durch die Alge *Peridinium gatunense*) in das Profundalsediment untersucht, um die zu verschiedenen Zeiten im Sediment aktiv am Algenabbau beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren. Zusätzlich sollte dieses

Inkubationsexperiment durch den Einsatz ^{13}C -angereicherter *Peridinium gatunense*-Zellen (s. II.3.2; Tabelle 3) Einblicke in den Kohlenstofffluss innerhalb des anaeroben Nahrungsnetzes in den anoxischen, methanogenen Sedimentschichten des Profundalsediments ermöglichen.

4.1 Biogeochemische Prozesse nach Zugabe von Algenbiomasse

Dieses Inkubationsexperiment wurde mit einer Sedimentprobe vom Juli 2004 bei *in situ* Temperatur von 15°C als Sedimentaufschlammungen durchgeführt (s. II.7.1.5). In Sedimentaufschlammungen wurde eine dem Jahreseintrag von 200 g FG m^{-2} Sediment entsprechende Menge gefriergetrockneter *Peridinium gatunense*-Zellen hinzugefügt, um die Sedimentation organischen Materials nach einer Algenblüte zu simulieren.

4.1.1 Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes und organischer Säuren

Der pH-Wert der Sedimentaufschlammungen aller Ansätze, d. h. mit Algenzugabe und ohne (Kontrollansatz), lag zu Beginn der Inkubation bei 8,2 (Abbildung 28). Während der ersten sechs Tage der Inkubation nahm der pH-Wert in allen Ansätzen ab. In den Sedimentaufschlammungen mit Algenzugabe wurde eine deutlich stärkere Absenkung des pH-Werts bis auf ca. 7,4 beobachtet, wohingegen der pH-Wert in den Ansätzen ohne Algenzugabe nur auf 7,9 absank. Anschließend blieben die pH-Werte aller Inkubationen relativ konstant.

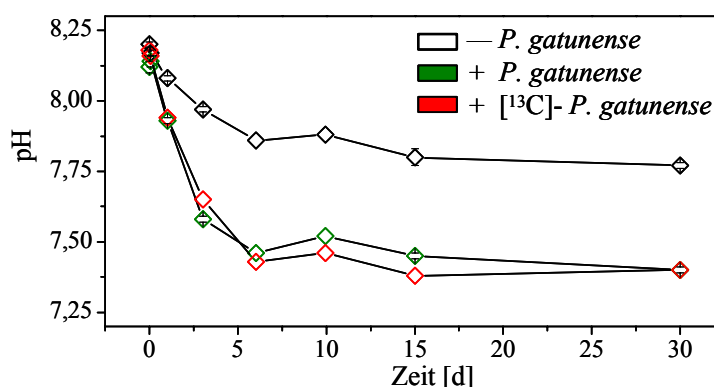


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der pH-Werte während der Inkubation bei 15°C in Sedimentaufschlammungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2004 nach Zugabe von nicht-markierten (grün) und ^{13}C -*P. gatunense*-Zellen (rot), und ohne Zugabe von *P. gatunense*-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen für die Inkubationen mit Zugabe von nicht-markierten *P. gatunense*-Zellen (grün) und von Ansätzen ohne Zugabe von *P. gatunense*-Zellen.

In den Kontrollansätzen ohne Algenzugabe konnten über die gesamte Dauer der Inkubation keine Fettsäuren nachgewiesen werden (Abbildung 29). Die Sedimentaufschlammungen befanden sich von Beginn der Inkubation an unter „Steady-State“-Bedingungen (s. auch Methanproduktion Abbildung 30 A). In den Ansätzen mit Zugabe ^{13}C -markierter und nicht-markierter *Peridinium gatunense*-Zellen wurden Acetat und Propionat detektiert. Während Acetat direkt von Beginn der Inkubation an detektiert wurde und zwischen Tag 3 und 6 die höchste Konzentration aufwies (0,26 bzw. 0,42 mM), begann die Akkumulation von Propionat etwas zeitverzögert mit einem Konzentrationsmaximum zwischen Tag 6 und 10 (um 0,3 mM). Nach 15-tägiger Inkubation sank die Acetatkonzentration unter die Nachweisgrenze und die Propionatkonzentration war auf 0,08 mM abgesunken. Nach 30 Tagen konnte auch kein Propionat mehr im Porenwasser der Sedimentaufschlammungen nachgewiesen werden.

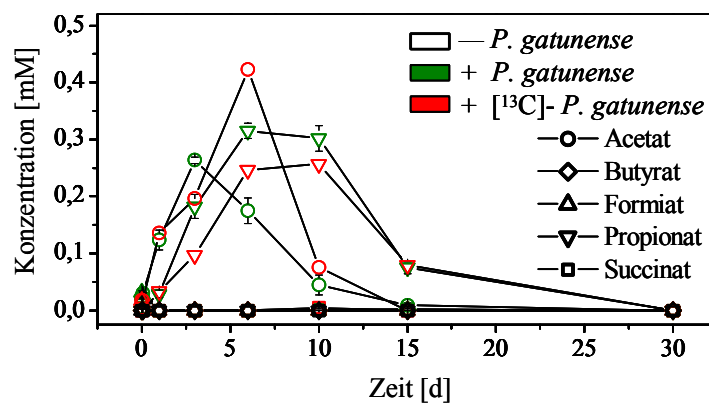


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Fettsäurekonzentrationen [mM] während der Inkubation bei 15°C in Sedimentaufschlammungen von Profundalsediment aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2004 nach Zugabe von nicht-markierten (grün) und ^{13}C -markierten *P. gatunense*-Zellen (rot) und ohne Zugabe von *P. gatunense*-Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen für die Inkubationen mit Zugabe von nicht-markierten *P. gatunense*-Zellen (grün) und von Ansätzen ohne Algenzugabe.

4.1.2 Zeitlicher Verlauf der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentration

Da die Kurven der Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffkonzentrationen in den Inkubationen mit ^{13}C -markierten und nicht-markierten *P. gatunense*-Zellen nahezu identisch über die Dauer der Inkubation verliefen (Abbildung 30), kann man davon ausgehen, dass die ^{13}C -Markierung der *P. gatunense*-Zellen und somit die verschiedenen isotopischen Zusammensetzungen der in die beiden Ansätze eingesetzten *P. gatunense*-Zellen keinen Einfluss auf deren Umsetzung hatten. Die Methanproduktion begann in allen

Ansätzen direkt mit Inkubationsbeginn und zeigte in den Ansätzen mit Algenzugabe ihre höchsten Raten ($0,40 \pm 0,01 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sedimentaufschlammung d}^{-1}$) zwischen Tag 2 und Tag 10 (s. Abbildung 30 A; in grün und rot dargestellt). Danach nahm die Rate kontinuierlich ab und glich sich von Tag 30 an die von Beginn der Inkubation an geringere und konstante Methanproduktionsrate der Kontrollansätze (ohne Algenzugabe; schwarz dargestellt) von $0,03 \pm 0,00 \mu\text{mol CH}_4 \text{ cm}^{-3} \text{ Sedimentaufschlammung d}^{-1}$ an. Die Abnahme der Methanproduktionsrate in den Ansätzen mit Algenzugabe ging direkt mit der in III.4.1.1 beschriebenen Konzentrationsverringerung von Acetat einher. Die Sedimentaufschlammungen mit Algenzugabe befanden sich somit nach 30-tägiger Inkubation unter „Steady-State“-Bedingungen nachdem alle leichtabbaubaren Verbindungen umgesetzt worden waren.

Die Verläufe der Kohlendioxidproduktion der verschiedenen Ansätze entsprachen denen des Methans (Abbildung 30 B), mit einer größeren Anfangsrate in den Ansätzen mit Algenzugabe und einer anschließenden Abflachung entsprechend den Kontrollansätzen. Da das Profundalsediment aufgrund des hohen CaCO_3 -Anteils (ca. 50 %) (Serruya, 1971) eine gute Pufferwirkung besitzt, entsprach der während der Inkubation gemessene Anstieg des $\text{CO}_2 (\text{g+aq})$ nicht der Gesamtkonzentration des produzierten Kohlendioxids.

Die Wasserstoffpartialdrücke zeigten in den Sedimentaufschlammungen mit Algenzugabe zwischen Tag 4 und 6 der Inkubation ein Maximum von ca. 4,8 Pa (Abbildung 30 C), während sie in den Kontrollansätzen über die gesamte Dauer der Inkubation relativ konstant auf Werten von ca. 0,2 Pa blieben. Nach 30 Tagen Inkubation glichen sich die Wasserstoffpartialdrücke der Ansätze mit Algenzugabe ebenfalls denen der Kontrollansätze von ca. 0,2 Pa an.

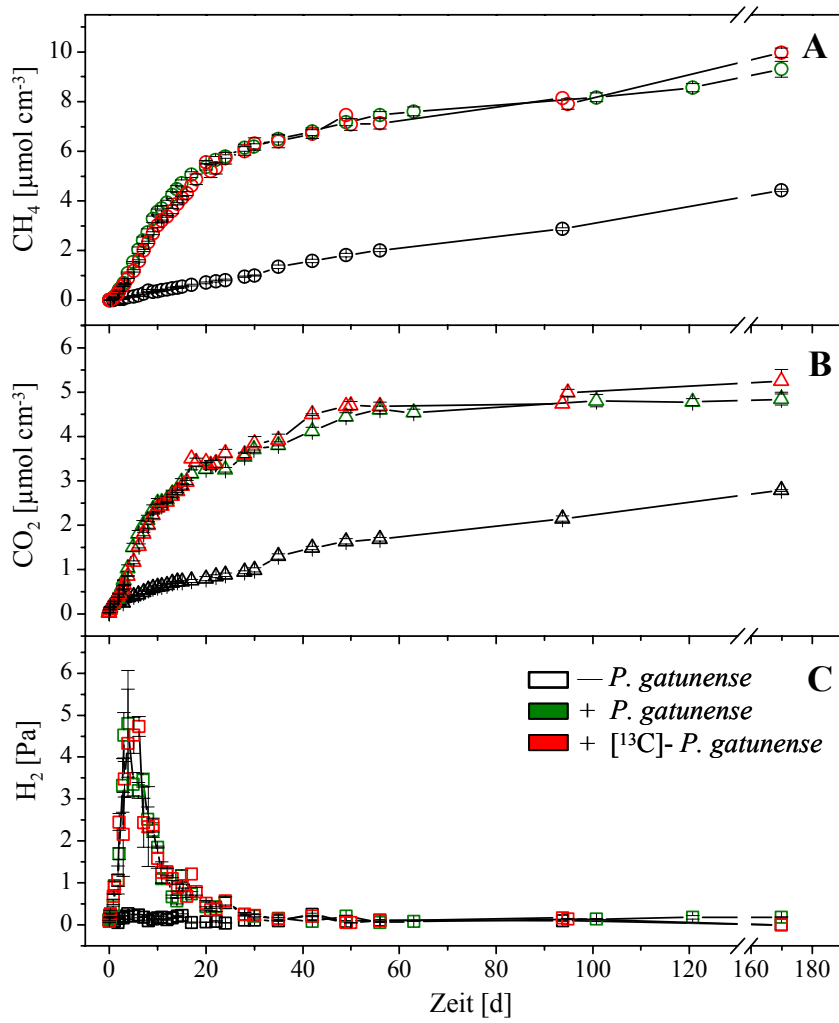


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der CH₄- (A), CO₂- (B) [$\mu\text{mol cm}^{-3}$ Sedimentaufschlammung] und H₂-Konzentrationen [Pa] (C) während der Inkubation bei 15°C in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2004 nach Zugabe von nicht-markierten (grün) und [¹³C]-*P. gatunense*-Zellen (rot), und ohne Zugabe von *P. gatunense*-Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von drei parallelen Ansätzen.

4.1.3 Zeitlicher Verlauf der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von Fettsäuren, Methan und Kohlendioxid

In Abbildung 31 A ist der zeitliche Verlauf des mittels HPLC-IRMS-Analyse ermittelten ^{13}C -Anteils (in atm %) der detektierten Fettsäuren in Sedimentaufschlämmungen nach Zugabe von ^{13}C -markierten *Peridinium gatunense*-Zellen dargestellt. Die Zunahme des Anteils der ^{13}C -Markierung von Acetat und Propionat verlief zeitgleich zu deren Konzentrationsverläufen (Abbildung 29). Der maximale Anteil an ^{13}C des aus den ^{13}C -markierten *P. gatunense*-Zellen (16,7 atm %) gebildeten Acetats und Propionats lag bei 13,9 bzw. 13,6 atm %. Die ^{13}C -Markierung wurde auch im gebildeten Methan und Kohlendioxid wiedergefunden, besaß aber nur einen maximalen Anteil von 11,8 atm % für $^{13}\text{CH}_4$ bzw. 10,1 atm % für $^{13}\text{CO}_2$ (Abbildung 31 B).

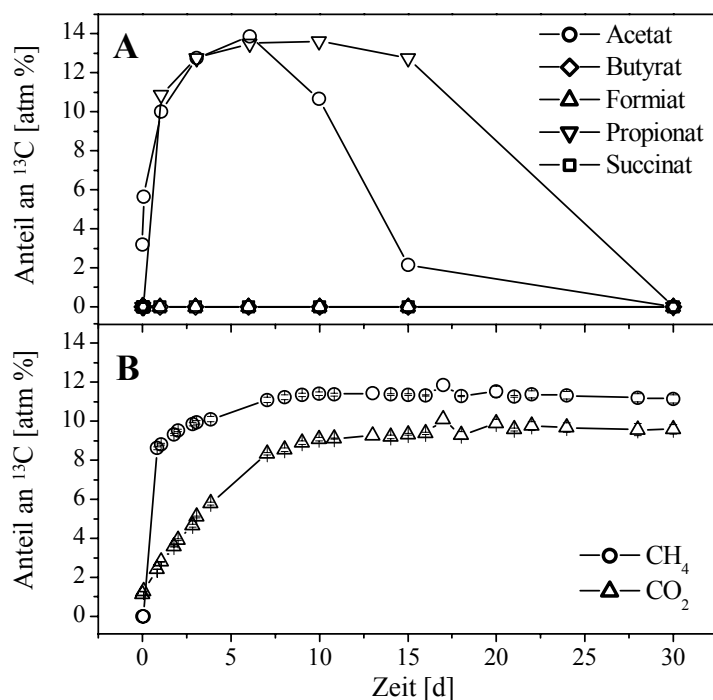


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf des Anteils an ^{13}C (in atm %) der detektierten Fettsäuren, des Methans und Kohlendioxids während der Inkubation bei 15°C nach Zugabe von $[^{13}\text{C}]$ -markierten *P. gatunense*-Zellen in Sedimentaufschlämmungen von Profundalsediment aus 0-10 cm Tiefe vom Juli 2004.

4.2 Aktiv am Abbau von Algenbiomasse beteiligte mikrobielle Populationen

Zur Identifizierung der zu verschiedenen Zeitpunkten aktiv an der Umsetzung der hinzugefügten Algenbiomasse (*P. gatumense*-Zellen) beteiligten *Bacteria* und *Archaea* wurden 16S rRNA-gestützte T-RFLP-Analysen der mikrobiellen Gemeinschaft durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von null, einem und sechs Tagen erfolgte die Extraktion von rRNA aus den Sedimentaufschlämmungen (jeweils drei Parallelen) mit nicht-markierten *P. gatumense*-Zellen und aus den Kontrollansätzen (ohne Algenzugabe).

4.2.1 Zeitliche Veränderungen in der Struktur der aktiven mikrobiellen Populationen

Zur Aufklärung möglicher zeitlicher und durch die Algenzugabe bedingter Veränderungen in den relativen Häufigkeiten bakterieller T-RFs wurde eine Standardisierung der Gesamtsignalintensitäten aller bakterieller T-RFLP-Muster der Kontrollansätze und der Ansätze mit Algenzugabe durchgeführt (s. II.5.7.3). Die bakteriellen T-RFLP-Muster der Kontrollansätze zeigten keine Veränderungen über die Zeit (Abbildung 32). In den T-RFLP-Mustern der bakteriellen Gemeinschaft konnten nach der Algenzugabe sowohl Veränderungen in der relativen Abundanz der T-RFs als auch in der Zusammensetzung der T-RFLP-Profile mit der Zeit beobachtet werden (Abbildung 32). Zum Zeitpunkt Null wurden insgesamt 26 T-RFs detektiert, die eine relative Abundanz >1 % aufwiesen (Abbildung 32). Die T-RFs mit einer Länge von 40, 68/70, 183, 204, 206, 210, 222/223 und 876 bp wiesen relative Häufigkeiten von über 4 % auf. Nach einem Tag Inkubation verringerte sich die relative Abundanz der meisten dieser zuvor dominanten T-RFs nur geringfügig, lediglich die relative Häufigkeit des 206-bp-T-RFs halbierte sich von 11 auf 5,7 %. Diese T-RFs zählten aber weiterhin zu den abundanteren T-RFs innerhalb des bakteriellen T-RFLP-Musters. Der nach eintägiger Inkubation neu detektierte T-RF der Länge 278 bp dominierte jedoch mit einer relativen Abundanz von >13 % (Abbildung 32) das T-RFLP-Muster. Zusätzlich wurde nach einem Tag Inkubation mit Algenzugabe ein T-RF der Länge 297/299 bp mit einer relativen Häufigkeit von 3 % detektiert. Nach sechs Tagen Inkubation hatte sich das T-RFLP-Profil der aktiven bakteriellen Gemeinschaft erneut verändert. Das T-RF der Länge 40 bp dominierte mit einer relativen Abundanz von ca. 26 % die bakterielle Gemeinschaft und die T-RFs der Länge 118, 215, 237, 251, 393, 410 und 412 bp wurden erstmalig detektiert (Abbildung 32).

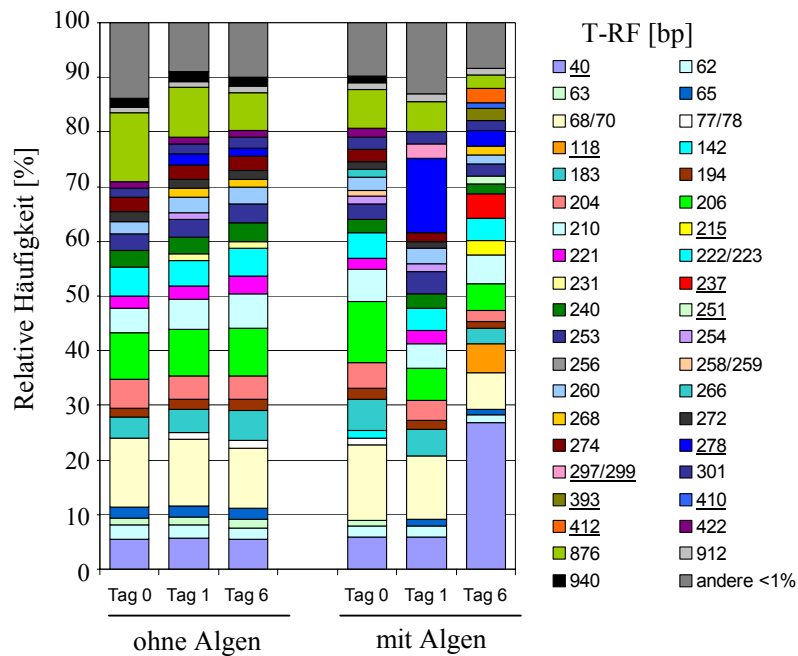


Abbildung 32: Relative Häufigkeiten bakterieller 16S rRNA-Fragmente (16S rcDNA) in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments (0-10cm Tiefe) ohne Zugabe von *P. gatumense*-Zellen zum Zeitpunkt Null (Tag 0), nach einem Tag und nach sechs Tagen sowie nach Zugabe von *P. gatumense*-Zellen zum Zeitpunkt Null (Tag 0), nach einem Tag und nach sechs Tagen Inkubation bei 15°C. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt (Tag 0, Tag 1, Tag 6) die gemittelten Häufigkeiten der einzelnen T-RFs von jeweils drei parallelen Sedimentaufschlämmungen basierend auf T-RFLP-Analysen revers-transkribierter bakterieller 16S rRNA nach Restriktion mit *Hae*III. Die Standardfehler einzelner T-RFs waren in der Mehrzahl der Fälle geringer als 1 %. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Die archaeellen T-RFLP-Profile zeigten sowohl in den Kontrollansätzen als auch in den Ansätzen mit Algenzugabe zu jedem Zeitpunkt der Inkubation drei Haupt-T-RFs mit einer Länge von 284, 392 und >700 bp (Abbildung 33). Das T-RF der Länge 284 bp trat in allen T-RFLP-Mustern mit der größten relativen Häufigkeit auf. In den Kontrollinkubationen konnten wie zuvor bei den bakteriellen T-RFLP-Profilen auch bei den archaeellen T-RFLP-Mustern keine Veränderungen in den relativen Häufigkeiten der T-RFs über die Zeit detektiert werden (Abbildung 33). In den Ansätzen mit Algenzugabe nahm dagegen die relative Abundanz des T-RFs der Länge 284 bp nach sechstägiger Inkubation von 49 % auf 62 % zu und die relative Häufigkeit des 392-bp-T-RFs und des >700-bp-T-RFs verringerte sich dementsprechend von 32 % auf 27 % bzw. von 19 % auf 12 %.

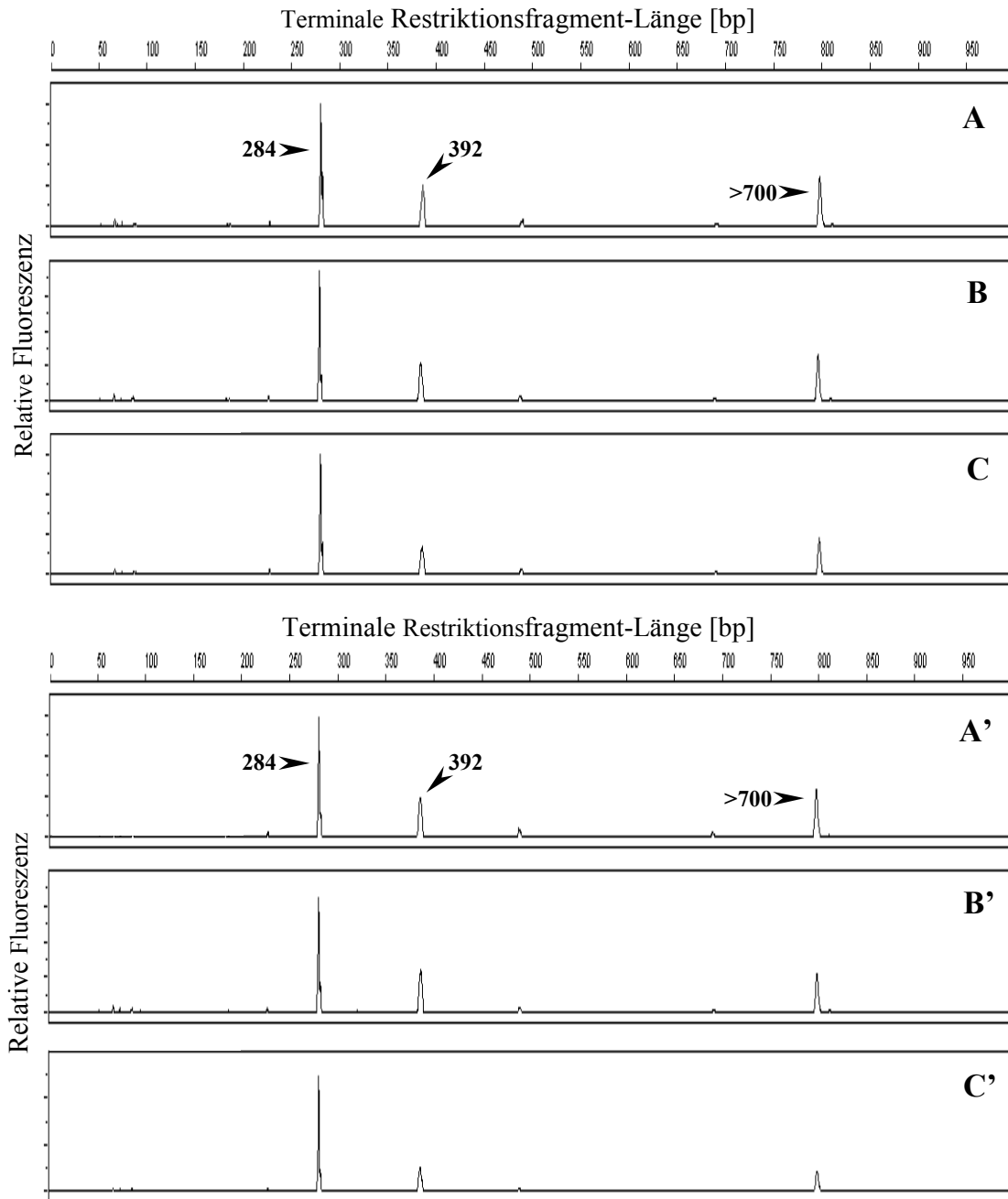


Abbildung 33: Struktur der aktiven archaeellen Gemeinschaft in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments (0-10cm Tiefe) ohne Zugabe von *P. gatunense*-Zellen zum Zeitpunkt Null (A), nach einem Tag (B) und nach sechs Tagen (C) Inkubation bei 15°C sowie nach Zugabe von *P. gatunense*-Zellen zum Zeitpunkt Null (A'), nach einem Tag (B') und nach sechs Tagen (C') Inkubation bei 15°C basierend auf T-RFLP-Analysen revers-transkribierter archaeeller 16S rRNA nach Restriktion mit *TaqI*. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. Die Abbildung zeigt exemplarisch für jeden Zeitpunkt ein T-RFLP-Profil der als Triplikate durchgeführten Sedimentaufschlämmungen. Die Standardfehler einzelner T-RFs innerhalb dieser Triplikate waren überwiegend geringer als 1 %.

4.2.2 Phylogenetische Analyse der am Abbau von Algenbiomasse beteiligten mikrobiellen Populationen

Mit Hilfe der unter III.1.1 beschriebenen Klonbibliotheken, die für archaeelle 16S rRNA-Gene und revers-transkribierte 16S rRNA aus dem Profundalsediment erzeugt worden waren, konnten die zu den verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 1 und 6) innerhalb der archaeellen T-RFLP-Muster detektierten T-RFs definierten archaeellen Taxa zugeordnet werden. Das 392-bp-T-RF konnte den hydrogenotrophen *Methanomicrobiaceae* und *Methanospirillaceae*, sowie der nicht-methanogenen „Group III“ (*Thermoplasma* und deren Verwandten) (Jurgens et al., 2000) innerhalb der *Euryarchaeota* zugeordnet werden. Das >700-bp-T-RF gruppierte ebenfalls in der „Group III“ der *Euryarchaeota*. Das dominante T-RF der Länge 284 bp wurde den acetoklastischen *Methanosaetaceae* mit *Methanosaeta concilii* als nächstem Verwandten zugeordnet.

Für die Zuordnung von T-RFs charakteristisch für bakterielle 16S rRNA zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation zu definierten bakteriellen Gruppen wurden drei Klonbibliotheken für revers-transkribierte 16S rRNA nach null, einem und sechs Tagen Inkubation hergestellt (Tabelle 29) und wie unter II.5.8.4 beschrieben analysiert. Die phylogenetische Analyse der drei Klonbibliotheken ließ auf eine sehr diverse, aktiv am Algenabbau beteiligte bakterielle Population schließen. Zum Zeitpunkt Null der Inkubation wurde die 16S rRNA von Sequenzen dominiert (40, 68/70, 183, 204, 206, 210 und 222/223 bp, s. Tabelle 29), die den *Deltaproteobacteria*, den *Bacteroidetes*, den *Chloroflexi*, den *Planctomycetes*, den *Betaproteobacteria* und den *Gammaproteobacteria* zugeordnet wurden. Nach einem Tag Inkubation wurde die aktive bakterielle Population von 16S rRNA-Sequenzen dominiert, die den *Deltaproteobacteria* zugeordnet werden konnten (T-RF 278 bp; Abbildung 32 und Tabelle 29). Innerhalb der *Deltaproteobacteria* waren diese Sequenzen am nächsten mit Sequenzen einer Familie von Sulfatreduzierern, den *Desulfobacteraceae*, mit einer Umweltsequenz Klon cws275 (Friedrich, 2002) bzw. mit *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 als nächst verwandtes Isolat verwandt (O'Neill, A. H. et al., unveröffentlicht). Auch die T-RFs der Länge 204, 206 und 210 bp, die schon zum Zeitpunkt Null eine hohe relative Abundanz aufwiesen und nach eintägiger Inkubation weiterhin einen relativ großen Anteil der bakteriellen 16S rRNA ausmachten (13,6 %), wurden Sequenzen der *Deltaproteobacteria* innerhalb der *Desulfobacterales*, *Syntrophobacterales* und *Myxococcales* zugeordnet (s. Tabelle 29). Das ebenfalls für Tag 1

der Inkubation charakteristische 297/299-bp-T-RF wurde den *Clostridiales* innerhalb der *Firmicutes* zugeordnet. Die nächst verwandten Sequenzen mit jeweils 99 % Sequenzidentität waren zwei Umweltsequenzen Klon LrhB59 und Klon M10Ba34, die in der Reiserhizosphäre (Lu et al., 2006) bzw. in Reisfeldboden (Lueders et al., 2004c) gefunden worden waren. Die nächst verwandten Isolate waren *Clostridium tunisiense* (95 % Sequenzidentität; Thabet et al., 2004) und *Clostridium aff. estertheticum* (97 % Sequenzidentität; Brambilla et al., 2001), die innerhalb des Clusters I der *Clostridia* gruppieren.

Nach sechs Tagen Inkubation wurde die aktive bakterielle Gemeinschaft von dem T-RF der Länge 40 bp dominiert. Die Mehrzahl der für dieses 40-bp-T-RF charakteristischen Klonsequenzen (71 %) wurden dem *Bacteroidetes*-Phylum zugeordnet (früher als *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-Gruppe oder *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*-Gruppe bezeichnet (Hugenholtz et al., 1998b; Garrity und Holt, 2001b; Kirchman, 2002). Die Klonsequenzen waren am nächsten mit den Umweltsequenzen Klon 033T7 (Sequenzidentität von 96 %; Weber et al., 2006) und Klon BS049 (Sequenzidentität von 97 %; Nakamura, Y et al., unveröffentlicht) verwandt. Die nächst verwandten Isolate waren *Cytophaga fermentans* (Sequenzidentität von 88-89 %; Gherna und Woese, 1992) und *Alkaliflexus imshenetskii* Z-7010^T (Sequenzidentität von 88 %; Zhilina et al., 2004). Zwei weitere Klonsequenzen, die dieses charakteristische T-RF zeigten, gruppieren innerhalb der *Gammaproteobacteria* mit Umweltklonsequenzen, die bislang keiner definierten phylogenetischen Gruppe innerhalb der *Gammaproteobacteria* zugeordnet wurden. Die nächst verwandte Sequenz mit 98 % Sequenzidentität war Klon 125ds10 aus einer Wasserprobe in 10 m Entfernung eines Gülletanks (Simpson et al., 2004). Das nächst verwandte Isolat war *Achromatium* sp. HK6 mit 90 % Sequenzidentität (Gray et al., 1999). Die T-RFs der Länge 118, 215, 251, 410 und 412 bp, die erstmalig nach sechs Tagen Inkubation auftraten, wurden auch den *Bacteroidetes* mit verschiedenen Umweltklonsequenzen als nächst verwandte Sequenzen zugeordnet (Tabelle 29). *Alkaliflexus imshenetskii* Z-7010^T war ebenfalls das nächst verwandte Isolat zu den Klonsequenzen mit den charakteristischen T-RFs der Länge 118 und 215 bp. Das T-RF der Länge 237 bp wurde den *Bacteriovorax* innerhalb der *Deltaproteobacteria* zugeordnet. Das T-RF der Länge 393 bp wurde von keiner der Klonsequenzen repräsentiert und konnte somit keiner phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden.

III. Ergebnisse

Tabelle 29: Zuordnung von 16S rcDNA-Klonsequenzen aus Klonbibliotheken von bakterieller revers-transkribierter 16S rRNA nach null, einem und sechs Tagen Inkubation mit *P. gatumense* zu phylogenetischen Gruppen der Domäne *Bacteria* und ihre Zuordnung zu T-RFs nach Restriktion mit *HaeIII*.

Phylogenetische Gruppe	Tag 0		Tag 1		Tag 6	
	Anzahl Klone	T-RF ^b [bp]	Anzahl Klone	T-RF ^b [bp]	Anzahl Klone	T-RF ^b [bp]
<i>Acidobacteria</i>	1	255	1	204		
<i>Actinobacteria</i>	2	237	1	92	1	212
<i>Bacteroidetes</i>	4	40* , 173, 410	8	40* , 370, 410	15	40* , 118 , <u>215</u> , <u>251</u> , 253, <u>412</u> , 910
<i>Chloroflexi</i>	7	68* , 218, 223 , 225, 228, 253, 263	14	68* , 185, 198, 215, 219, 221, 222 , 223* , 256, 279	9	64, 75, 221, 222* , 223* , 230, 259, 263, 265
<i>Cyanobacteria</i>	4	139, 183 , 295	2	183	1	318
<i>Deferribacteres</i>	4	81, 294, 302	2	268, 302		
<i>Fibrobacteres</i>	1	255	1	324		
<i>Firmicutes</i>						
<i>Clostridiales</i>			5	221, 255, <u>297</u> , <u>299</u>		
<i>Fusobacteria</i>	1	154	1	280		
<i>Planctomycetes</i>	10	70* , 81, 146, 147, 207, 215, 227, 236, 276	4	172, 219, 268	3	172, 238, 252
<i>Spirochaetes</i>	1	244	1	196	4	183, 208, 220
<i>Verrucomicrobia</i>	3	142, 181, 204*	8	68* , 258, 223* , 179, 190	2	223* , 422
<i>Alphaproteobacteria</i>						
<i>Rhizobiales</i>			2	40* , 196		
<i>Betaproteobacteria</i>						
<i>Burkholderiales</i>	1	218				
<i>Hydrogenophilales</i>	1	70*	1	220		
<i>Nitrosomonadales</i>	1	222			1	222*
<i>Rhodocyclales</i>			1	220	4	199, 222*
<i>Gammaproteobacteria</i>						
<i>Alteromonadales</i>	1	40*				
<i>Chromatiales</i>	2	77, 178			2	187
<i>Methylococcales</i>	10	70* , 78, 252	6	70 , 244, 252	8	70
nicht klassifiziert	2	198, 405			3	40* , 199
<i>Deltaproteobacteria</i>						
<i>Bdellovibrionales</i>					2	237
<i>Desulfobacterales</i>	12	79, 210 , 212, 242, 274, 940	15	191, 194, 210 , 211, 217, 242, 276, <u>278</u> , 427, 940	5	42, 191, 206 , 210 , 212, 258
<i>Desulfuromonales</i>	2	210 , 217			1	207
<i>Myxococcales</i>	3	68* , 194, 224	3	204 , 206 , 236		
<i>Syntrophobacterales</i>	8	78, 204* , 206	4	78, 204 , 240	2	204, 205
nicht klassifiziert					2	245
<i>Epsilonproteobacteria</i>						
<i>Campylobacterales</i>			1	545		
candidate division OP3	1	245			2	88, 253
C. „ <i>Endomicrobia</i> “	2	266, 286	1	216		
Chloroplast	5	314, 876	1	876	1	876
unbekannte Zuordnung	1	69			1	339

Die Längen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. T-RFs mit einem relativen Anteil von mehr als 4 % innerhalb eines T-RFLP-Musters sind „fett“ dargestellt (s. Abbildung 32). Die mit einem Stern „*“ gekennzeichneten T-RFs wurden in mehr als einer phylogenetischen Gruppe detektiert. Die unterstrichenen T-RFs sind spezifisch für einen der Zeitpunkte bzw. stehen für eine starke Zunahme der relativen Abundanz dieses T-RFs. C.: Candidatus.

4.2.3 Aktive mikrobielle Populationen nach sechstägiger Inkubation – RNA-SIP

Um die nach sechs Tagen Inkubation mittels vergleichender T-RFLP-Analyse identifizierten *Bacteria* und *Archaea* direkt mit der zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Akkumulation von Acetat und Propionat in Verbindung bringen zu können (s. Abbildung 29 und 31), wurde die Stable-Isotope-Probing-Methode mit RNA-Extrakten der mit ^{13}C -markierten Algen inkubierten Sedimentaufschlämmungen und der mit nicht-markierten Algen inkubierten Sedimentaufschlämmungen (Kontrolle) durchgeführt. In Abbildung 34 und 35 sind im Vergleich die T-RFLP-Profile der archaeellen bzw. bakteriellen Gemeinschaften der Sedimentaufschlämmungen nach sechs Tagen Inkubation mit Zugabe von ^{13}C -markierten Algen und nicht-markierten Algen vor der Dichtegradientenzentrifugation dargestellt. Die T-RFLP-Analyse der archaeellen Gemeinschaft beider Ansätze zeigte ein identisches Muster mit drei Haupt-T-RFs der Länge 284, 392 und >700 bp wie bereits zuvor beschrieben (s. III.4.2.1). Die T-RFLP-Profile der bakteriellen Gemeinschaft wiesen ebenfalls eine annähernd identische Struktur auf. Eine Ausnahme war jedoch das T-RF der Länge 255 bp, das mit einer sehr hohen relativen Abundanz ausschließlich mit Zugabe von ^{13}C -markierten Algen detektiert wurde (Abbildung 35 B). Da in den T-RFLP-Analysen der drei parallelen Sedimentaufschlämmungen mit nicht-markierten *P. gatunense*-Zellen (s. Abbildung 32 und Beschreibung III.4.2.1) kein T-RF der Länge 255 bp detektiert wurde, könnte es sich bei diesem unbekannten T-RF um eine durch die Zugabe der ^{13}C -markierten Algen verursachte bakterielle Kontamination gehandelt haben.

III. Ergebnisse

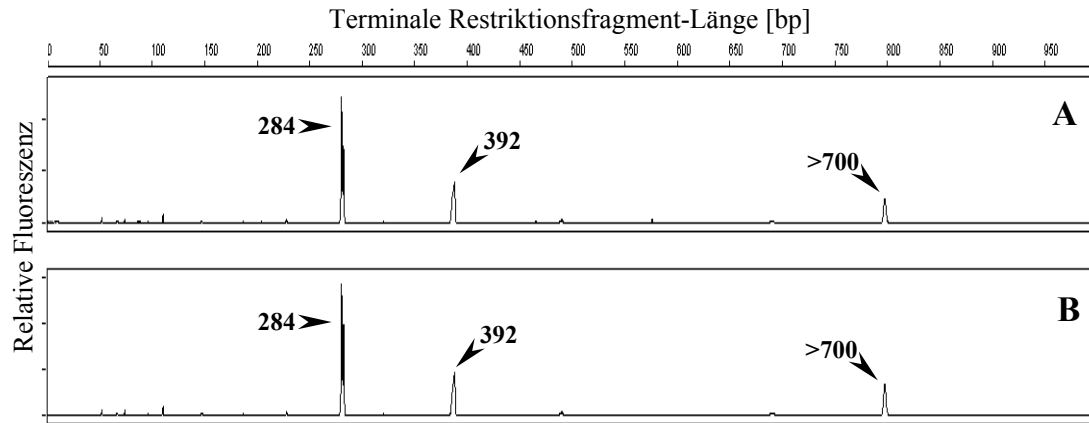


Abbildung 34: Struktur der aktiven archaeellen Gemeinschaft vor der Dichtegradientenzentrifugation in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach Zugabe von nicht-markierten (A) und [^{13}C]-markierten *P. gatunense*-Zellen (B) nach sechs Tagen Inkubation bei 15°C basierend auf T-RFLP-Analysen revers-transkribierter archaeeller 16S rRNA nach Restriktion mit *TaqI*. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

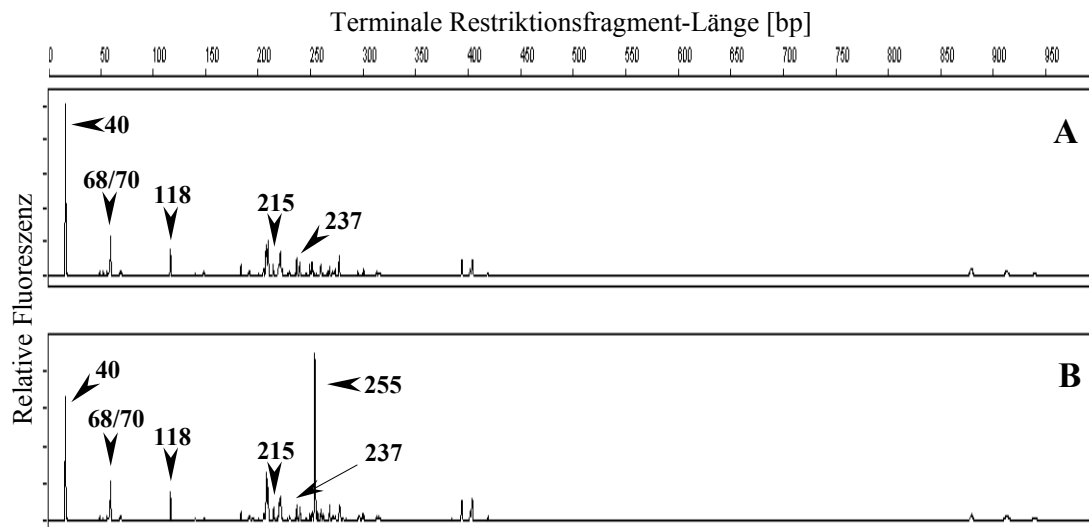


Abbildung 35: Struktur der aktiven bakteriellen Gemeinschaft vor der Dichtegradientenzentrifugation in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach Zugabe von nicht-markierten (A) und [^{13}C]-markierten *P. gatunense*-Zellen (B) nach sechs Tagen Inkubation bei 15°C basierend auf T-RFLP-Analysen revers-transkribierter bakterieller 16S rRNA nach Restriktion mit *HaeIII*. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Nach der Auftrennung der rRNA beider Ansätze mittels Dichtegradientenzentrifugation erfolgte eine reverse Transkription der 16S rRNA jeder Fraktion mit domänespezifischen Primern und anschließender PCR (Abbildung 36). Der Hauptanteil der archaeellen und bakteriellen 16S rRNA der Inkubationen mit nicht-markierten Algen wurde nach der Dichtegradientenzentrifugation in den „leichten“, für nicht-markierte Ribonukleinsäure charakteristischen Fraktionen wiedergefunden (Abbildung 36 A und C). In den Ansätzen mit ^{13}C -markierten Algen war ein geringer Anteil der archaeellen und bakteriellen 16S rRNA in Richtung der „schweren“ Fraktionen mit höherer Dichte (über $1,80 \text{ g ml}^{-1}$ CsTFA) gewandert (Abbildung 36 B und D). Während sich der Hauptanteil der archaeellen 16S rRNA in den Fraktionen der Dichte von $1,764$ bis $1,781 \text{ g ml}^{-1}$ CsTFA befand, die noch der Dichte nicht-markierter RNA entsprechen, sammelte sich ein großer Anteil der bakteriellen 16S rRNA in den Fraktionen der Dichten von $1,776$ bis $1,791 \text{ g ml}^{-1}$ CsTFA.

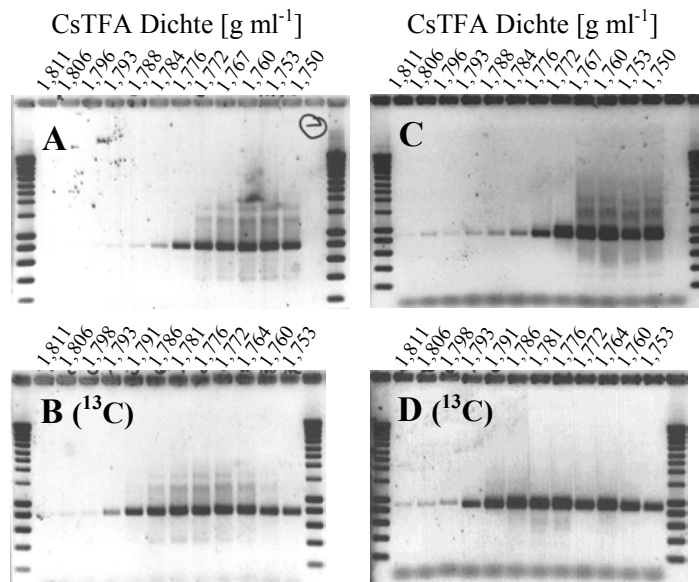


Abbildung 36: Verteilung der Nukleinsäure in einzelnen Gradientenfraktionen nach RT-PCR mit domänespezifischen Primern. Archaeelle 16S rRNA nach Inkubationen mit nicht-markierten (A) und mit ^{13}C -markierten (B) *P. gatunense*-Zellen. Bakterielle 16S rRNA nach Inkubationen mit nicht-markierten (C) und mit ^{13}C -markierten (D) *P. gatunense*-Zellen.

Um die durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten, ^{13}C -markierten bzw. nicht-markierten, archaeellen bzw. bakteriellen Populationen miteinander vergleichen zu können, wurde von allen Fraktionen eine T-RFLP-Analyse basierend auf 16S rRNA durchgeführt (s. Abbildung 37-39). Die Auswertung und Standardisierung der bakteriellen

T-RFLP-Profile des Ansatzes mit ^{13}C -markierten Algen erfolgte jedoch ohne Berücksichtigung des durch die Kontamination verursachten 255-bp-T-RFs.

In Abbildung 39 sind die untereinander standardisierten bakteriellen T-RFLP-Profile nach sechstägiger Inkubation mit nicht-markierten und ^{13}C -markierten Algen im Vergleich zueinander dargestellt, d. h. T-RFLP-Muster von der „Gesamtgemeinschaft“ vor der Dichtegradientenzentrifugation und von den einzelnen Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die T-RFLP-Muster der „leichten“ und „schweren“ Fraktionen des Kontrollansatzes zeigten eine sehr ähnliche Struktur, d. h. sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in der relativen Abundanz der einzelnen T-RFs zueinander sowie zu der bakteriellen Gesamtgemeinschaft vor der Dichtegradientenzentrifugation, zueinander. In den bakteriellen T-RFLP-Mustern der Fraktionen des Ansatz mit ^{13}C -markierten Algen konnte man dagegen geringe Unterschiede zwischen den „leichten“ und „schweren“ Fraktionen erkennen. Es kam jedoch zu keiner eindeutigen Veränderung in der Zusammensetzung der bakteriellen Populationen der „leichten“ und „schweren“ Fraktionen, sondern hauptsächlich zu Veränderungen in den relativen Häufigkeiten einzelner T-RFs. Bei diesen T-RFs, die eine solche Veränderung zeigten, handelte es sich um diejenigen T-RFs, die wie zuvor beschrieben (s. III.4.2.1), zum ersten Mal nach sechstägiger Inkubation mit Algen detektiert wurden. Das T-RF der Länge 215 bp, dem *Alkaliflexus imshenetskii* aus dem *Bacteroidetes*-Phylum als nächst verwandtes Isolat zugeordnet wurde (s. Abbildung 39), war das einzige, das aufgrund einer ^{13}C -Anreicherung eindeutig in Richtung der „schwereren“ Fraktionen gewandert war. Die T-RFs der Länge 40, 118, 237, 251, 278, 393 und 410 bp nahmen in den Fraktionen höherer Dichte (1,776-1,791 g ml $^{-1}$ CsTFA), in denen sich der größte Anteil der bakteriellen RNA nach der Dichtegradientenzentrifugation gesammelt hatte, in ihrer relativen Häufigkeit um jeweils 1 bis 6 % zu (Abbildung 39). Die archaeellen T-RFLP-Profile sowohl aller Fraktionen des Ansatzes mit nicht-markierten Algen als auch alle T-RFLP-Profile des Ansatzes mit ^{13}C -markierten Algen zeigten das gleiche Muster mit den drei Haupt-T-RFs der Länge 284, 392 und >700 bp wie vor der Auftrennung mittels Dichtegradientenzentrifugation (s. Abbildung 34). Obwohl es in dem Ansatz mit ^{13}C -markierten Algen zu einer geringen ^{13}C -Anreicherung der archaeellen 16S rRNA kam, wodurch eine ausreichende Menge an 16S rRNA für eine T-RFLP-Analyse dieser „schweren“ archaeellen Population vorhanden war (Fraktion F2: 1,811 mg ml $^{-1}$ CsTFA), konnte kein Unterschied in der Struktur der archaeellen Populationen der „leichten“ und dieser „schweren“ Fraktion beobachtet werden.

III. Ergebnisse

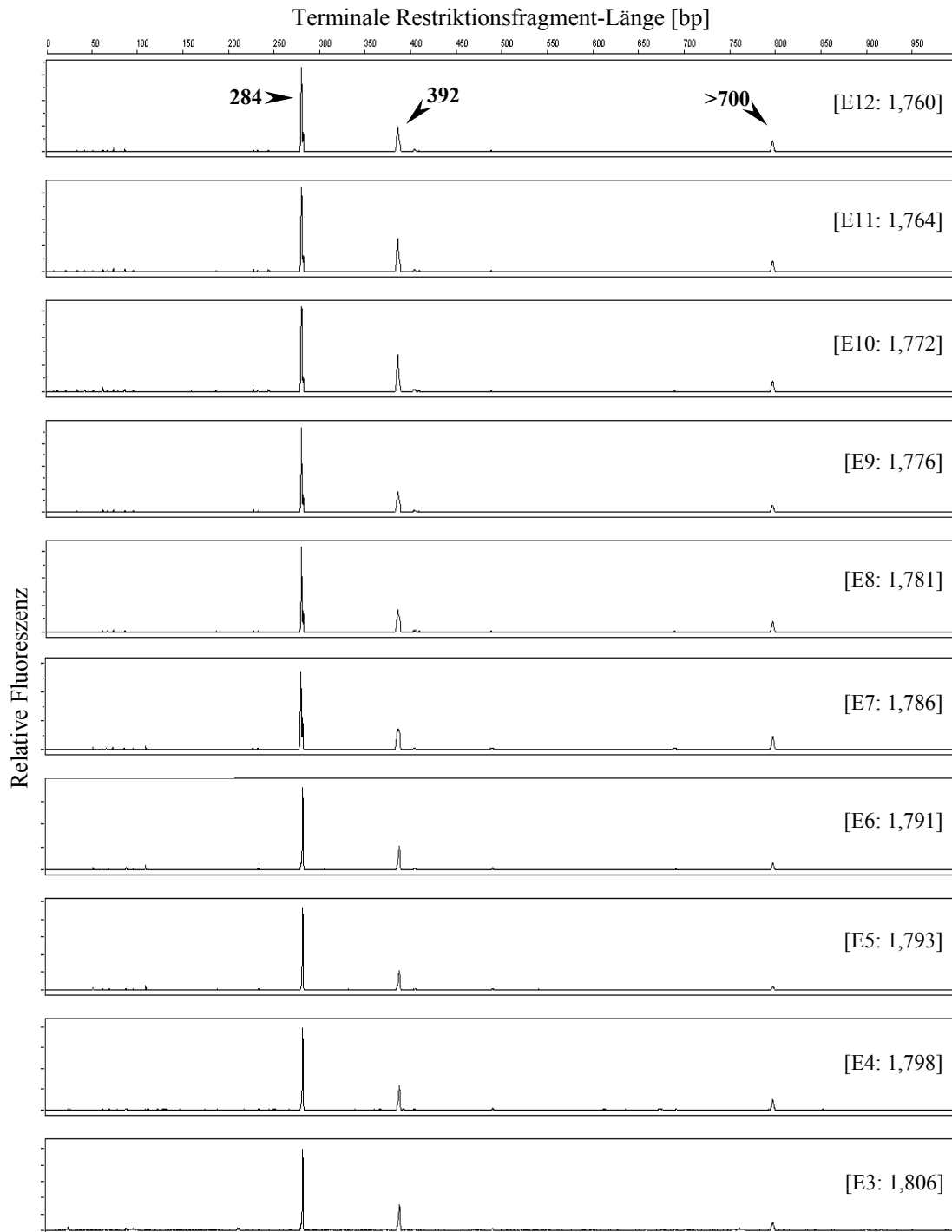


Abbildung 37: T-RFLP-Muster der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten revers-transkribierten archaeellen 16S rRNA aus „leichten“ und „schweren“ Gradientenfraktionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach sechs Tagen Inkubation mit (nicht-markierten) *P. gatumense*-Zellen. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen ist in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

III. Ergebnisse

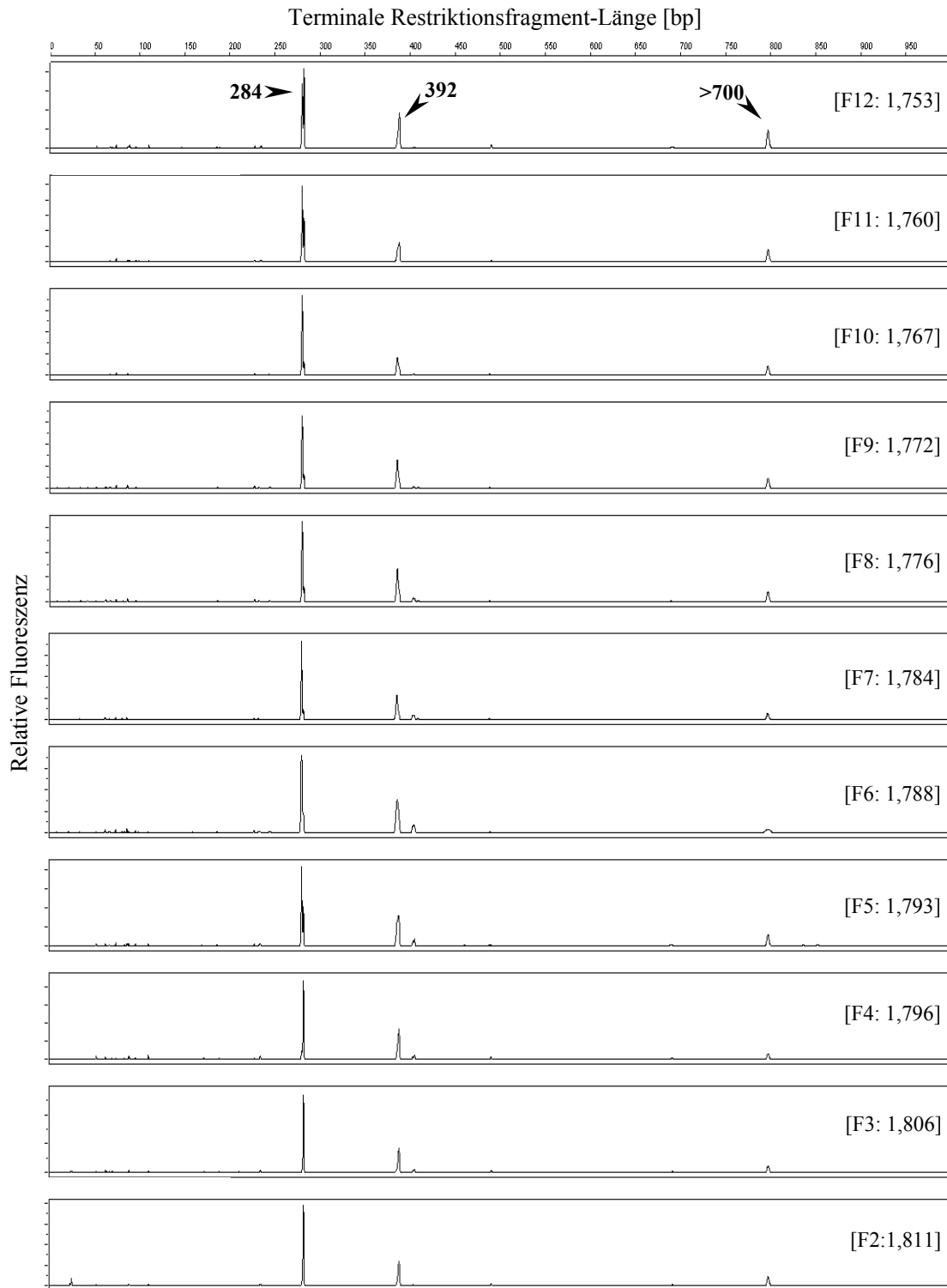


Abbildung 38: T-RFLP-Muster der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten revers-transkribierten archaeellen 16S rRNA aus „leichten“ und „schweren“ Gradientenfractionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach sechs Tagen Inkubation mit $[^{13}\text{C}]$ -markierten *P. gatumense*-Zellen. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen ist in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

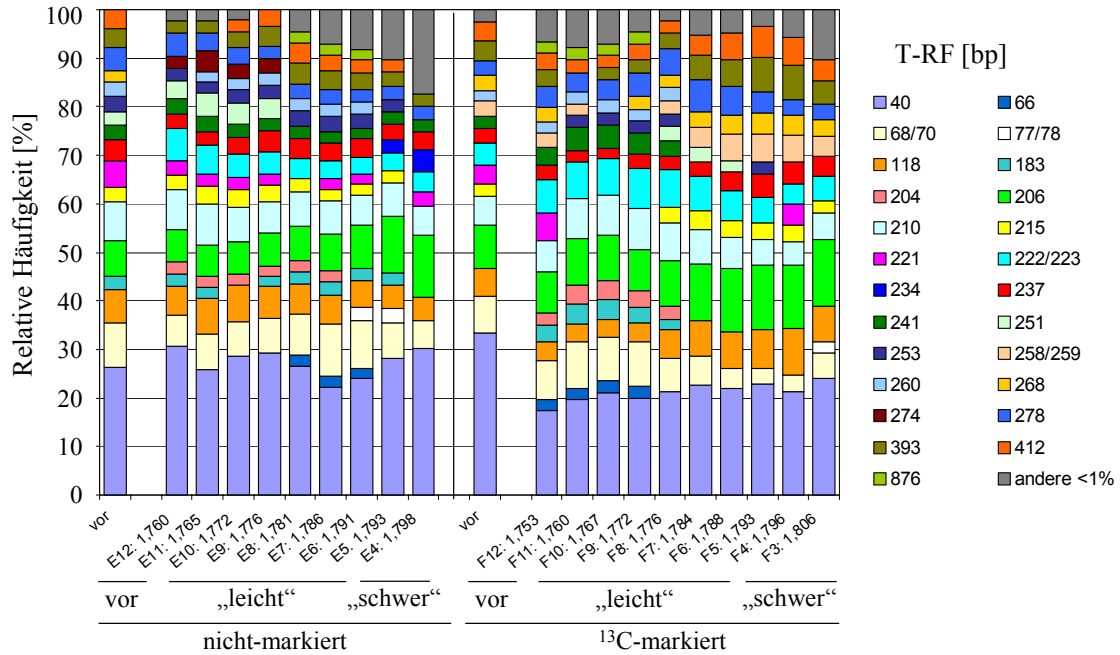


Abbildung 39: Relative Häufigkeiten bakterieller 16S rRNA-Fragmente (16S rcDNA) in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediment nach Inkubation (Tag 6) mit nicht-markierten und ¹³C-markierten *P. gatunense*-Zellen. Dargestellt sind die T-RFLP-Muster der bakteriellen Gemeinschaft vor der Dichtegradientenzentrifugation und der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten bakteriellen Gemeinschaft der rRNA-Gradientenfraktionen nach reverser Transkription und Restriktion mit *Hae*III. Die Bezeichnungen „leicht“ und „schwer“ beziehen sich auf die ¹³C-Anreicherung der mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten rRNA.

IV. Diskussion

1. Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See

Genezareth

Prokaryoten stellen den Hauptanteil der Biomasse in Sedimenten von Süßwasserseen dar (Nealson, 1997) und spielen eine wesentliche Rolle am Abbau und der Remineralisierung von sedimentiertem organischen Material in diesen Ökosystemen. Die Aufklärung der Struktur und phylogenetischen Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft von Süßwasserseesedimenten kann daher zu einem besseren Verständnis der in diesem aquatischen Habitat ablaufenden biogeochemischen Prozesse beitragen.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine umfassende molekularbiologische Untersuchung sowohl der quantitativen als auch der qualitativen Zusammensetzung der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft in den anoxischen Sedimentschichten des Profundals eines Süßwassersees durchgeführt. Die Untersuchung basierte auf einer Analyse der bakteriellen und archaeellen 16S rRNA-Gene von drei Proben (Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004) des Profundalsediments des See Genezareth mittels quantitativer „real-time“-PCR sowie T-RFLP- und vergleichender Sequenzanalyse (s. III.1).

Die Abundanz archaeeller und bakterieller 16S rRNA-Gen-Kopien zeigte keine wesentliche Schwankung zwischen den drei Proben des Profundalsediments (s. III.1.1; Abbildung 7). Die durchschnittliche Anzahl archaeeller und bakterieller 16S rRNA-Gen-Kopien, die mittels quantitativer „real-time“-PCR gemessen wurden, waren mit ca. 10^8 archaeellen und 10^{10} bakteriellen 16S rRNA-Gen-Kopien pro cm^3 Sediment hoch. Unter der Annahme, dass im Durchschnitt pro Genom und Zelle vier Kopien des 16S rRNA-Gens vorhanden sind (Klappenbach et al., 2000), wurden die durchschnittlichen Zellzahlen auf ungefähr 5×10^9 bakterielle und 3×10^7 archaeelle Zellen pro cm^3 Sediment berechnet. Vergleichbare archaeelle und bakterielle Zellzahlen wurden durch direkte Zellzählung für andere Süßwasserseesedimente bestimmt (Goedkoop und Johnson, 1996; Zepp-Falz et al., 1999; Wobus et al., 2003; Tamaki et al., 2005).

Die Struktur und phylogenetische Diversität der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft wurde mit Hilfe der T-RFLP-Analyse und vergleichender Sequenzanalyse untersucht. Da die T-RFLP-Methode eine PCR-basierte Technik ist, können die erzeugten T-RFLP-Profile durch PCR-bedingte Fehlerquellen beeinflusst werden (von Wintzingerode et al., 1997). Daher könnte die absolute quantitative Zusammensetzung der

mikrobiellen Gemeinschaft nicht korrekt durch die ermittelten relativen Häufigkeiten der 16S rRNA-Genfragmente wiedergegeben werden. Lueders und Friedrich (2003) konnten jedoch für eine definiert zusammengesetzte mikrobielle Modellgemeinschaft zeigen, dass die 16S rRNA-Gen-basierte PCR-T-RFLP-Analyse ein adäquates Bild der relativen Zusammensetzung von 16S rRNA-Genfragmenten wiedergab. Da alle Proben in dieser Arbeit mittels identischer PCR-Bedingungen analysiert wurden, sollten alle T-RFLP-Profile in gleicher Weise von potentiellen PCR-bedingten Fehlern betroffen gewesen sein, wodurch ein direkter Vergleich dieser Proben untereinander möglich ist. Zusätzlich bestätigten die sehr geringen Standardfehler, die für die einzelnen T-RFs innerhalb der T-RFLP-Profile dreier paralleler Nukleinsäureextraktionen von den Sedimentproben bestimmt wurden und in der Mehrzahl der Fälle <1 % waren, die hohe Reproduzierbarkeit der T-RFLP-Methode.

Die relativen Häufigkeiten der dominanteren phylogenetischen Gruppen innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* in den T-RFLP-Profilen der drei Proben des Profundalsediment des See Genezareth sind in Tabelle 30 aufgeführt. Da einige der T-RFs durch mehr als eine phylogenetische Gruppe repräsentiert wurden, konnte die Abundanz dieser Gruppen in den T-RFLP-Mustern nur als Frequenzbereich angegeben werden. Die Berechnung der kleinsten relativen Häufigkeit dieses Bereichs erfolgte, indem nur die T-RFs, die repräsentativ für eine einzige phylogenetische Gruppe waren, berücksichtigt wurden. Die größte relative Abundanz einer phylogenetischen Gruppe wurde unter Berücksichtigung auch solcher T-RFs berechnet, die durch mehrere phylogenetische Gruppen repräsentiert wurden. Diese Limitierung der T-RFLP-Methode in der Auflösung sehr diverser mikrobieller Gemeinschaften wurde auch durch die berechneten Shannon-Wiener-Diversitätsindizes (H') der bakteriellen T-RFLP-Profile der drei Sedimentproben reflektiert, die im Vergleich zur Gesamtdiversität der bakteriellen Klonsequenzen geringere H' -Werte besaßen. Die für die T-RFLP-Muster berechneten H' -Werte in dieser Arbeit waren jedoch höher als Diversitätsindizes aus Studien von vergleichbar diversen Süßwasserseesedimenten, in denen andere Fingerabdruckmethoden zur Charakterisierung der Struktur mikrobieller Gemeinschaften benutzt worden waren. Die Analyse einer mikrobiellen Gemeinschaft eines Süßwasserseesediments mittels DGGE lieferte z. B. H' -Werte von 1,20-2,26 (Koizumi et al., 2003a). Dies demonstriert erneut, dass die T-RFLP-Methode eine höher auflösende und somit eine geeignetere Fingerabdruckmethode zum Vergleich komplexer mikrobieller Gemeinschaft darstellt (Moeseneder et al., 1999; Dunbar et al., 2000).

Die Zuordnung repräsentativer bakterieller Klonsequenzen zu phylogenetischen Gruppen zeigte, dass die relative Zusammensetzung der Klonbibliotheken mit der für die bakterielle Gemeinschaft generierten T-RFLP-Profile weitgehend übereinstimmte (Tabelle 30). Bei der Anwendung eines Schwellenwertes von 97 % Sequenzidentität, um Sequenzen verschiedenen Arten zu zuordnen (Stackebrandt und Goebel, 1994), wurden 77 verschiedene bakterielle Arten in den zwei Klonbibliotheken detektiert (insgesamt 98 Klonsequenzen, s. III.1.3; Tabelle 26). Der mittels Chao1 als nicht-parametrischem Indikator berechnete potentiell vorhandene bakterielle Artenreichtum im Profundalsediment des See Genezareth betrug 272 Arten mit einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 169 und 492. Die berechnete Anzahl an Arten lag somit um einiges über der experimentell detektierten Anzahl. Die hohe Diversität der bakteriellen Gemeinschaft wurde auch durch den für die experimentell detektierten Arten berechneten hohen Shannon-Wiener-Diversitätsindex und die Shannon-Eveness bestätigt. Die Shannon-Eveness besagte, dass sich 71 % der detektierten OTUs aus der gleichen Anzahl an Klonsequenzen zusammensetzten. Da insgesamt 77 verschiedene Arten (OTUs) in den Klonbibliotheken detektiert worden waren, wurden die meisten der OTUs nur durch eine einzige Klonsequenz repräsentiert. Diese hohe phylogenetische Diversität der *Bacteria* ist charakteristisch für Sedimente von Süßwasserseen (Torsvik et al., 1996; Spring et al., 2000).

Die mittels paarweiser Vergleiche von den T-RFLP-Mustern der drei Sedimentproben berechneten Morisita-Indizes zeigten (s. III.1; Tabelle 23 und 25), dass sowohl die T-RFLP-Profile der archaeellen als auch der bakteriellen Gemeinschaft sehr ähnlich zwischen den drei Proben (Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004) waren. Eine derartige Stabilität in der Struktur mikrobieller Gemeinschaften wurde bereits für viel dynamischere Ökosysteme wie eine Cyanobakterienmatte in einer heißen Quelle (Ferris und Ward, 1997) oder gefluteten Reisfeldboden (Lueders und Friedrich, 2000) beobachtet. Da die Probenahmen der drei Sedimentproben zu verschiedenen Zeitpunkten stattgefunden hatten (Januar 2003, Juli 2003 und Oktober 2004), deuteten die Ergebnisse der T-RFLP-Analysen ferner darauf hin, dass die bakterielle und archaeelle Gemeinschaft auch bezüglich der Zeit sehr stabil waren. Eine hohe zeitliche Stabilität der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft wurde neben diesen 16S rRNA-Gen-basierten Daten auch in 16S rRNA-gestützten T-RFLP-Analysen der Kontrollinkubationen des unter III.4.2.1 beschriebenen Inkubationsexperiments festgestellt.

Tabelle 30: Relative Abundanz (in %) phylogenetischer Gruppen der *Bacteria* und *Archaea* in 16S rRNA-Gen-Klonbibliotheken und T-RFLP-Mustern der mikrobiellen Gemeinschaft des Profundalsediments des See Genezareth ^a.

Phylogenetische Gruppe	Klonbibliotheken	T-RFLP-Analyse		
		Januar 2003	Juli 2003	Oktober 2004
<i>Bacteria</i>				
<i>Acidobacteria</i>	4,1	ND	0-0,4	0-1,8
<i>Bacteroidetes</i>	15,3	11,6-19,0	8,9-17,2	7,7-17,2
<i>Chlorobi</i>	6,1	2,0	ND	1,1
<i>Chloroflexi</i>	8,1	13,0-16,0	6,4-7,7	2,8-4,3
<i>Deferribacteres</i>	1,0	ND	ND	0-1,2
<i>Firmicutes</i>	1,0	0,5	ND	ND
<i>Nitrospira</i>	1,0	0,4	0,7	0,2
<i>Planctomycetes</i>	2,0	NZ	NZ	NZ
<i>Verrucomicrobia</i>	5,1	1,9-4,7	1,8	2,5
<i>Alphaproteobacteria</i>	3,1	0-7,4	0-9,2	0-7,7
<i>Betaproteobacteria</i>	4,1	2,4-4,7	2,9-6,2	2,8-7,0
<i>Gammaproteobacteria</i>	6,1	7,8-16,7	8,4-19,0	6,8-16,1
<i>Deltaproteobacteria</i>	25,5	16,3	22,5	24,1-26,1
<i>Epsilonproteobacteria</i>	1,0	ND	ND	ND
candidate divison OP11	2,0	2,1	4,2	4,3
candidate divison OP3	1,0	ND	ND	ND
candidate divison TM6	1,0	NZ	NZ	NZ
candidate divison TM7	1,0	0,4	0,5	0,2
Chloroplast	5,1	1,3	1,7	0,5
<i>Archaea</i>				
<i>Methanomicrobiales</i>	76,6 ^b	5,5-49,9	5,5-55,5	5,1-55,9
<i>Methanosarcinales</i>	ND ^{b,c}	15,3	15,0	21,6
<i>Methanobacteriales</i>	6,7 ^b	8,8	7,8	5,2
Group III (<i>Thermoplasma</i>)	16,7 ^b	20,4-64,8	16,7-66,6	14,0-64,9

ND, nicht detektiert.

NZ, nicht zuweisbar.

^a Die Erklärung des Auftretens T-RFLP-basierender Frequenzbereiche ist unter IV.1 im Text zu finden.

^b Die berechnete relative Abundanz (%) bezieht sich auf Daten von Nüsslein et al. (2001).

^c *Methanosaetaceae*-verwandte Klonsequenzen wurden nur von revers-transkribierter 16S rRNA erhalten.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass *Archaea* gewöhnlich den kleineren Anteil an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft ausmachen (Zepp-Falz et al., 1999; Koizumi et al., 2003b; Koizumi et al., 2004). Dies stimmt mit den in dieser Arbeit mittels quantitativer „real-time“-PCR ermittelten Daten überein, aus denen geschlossen werden konnte, dass die *Archaea* nur einen geringen Anteil (ungefähr 1 %) der prokaryotischen Gemeinschaft des Profundalsediments (0-10 cm) repräsentierten. Mit Hilfe der T-RFLP-Analyse und vergleichender Sequenzanalyse war es möglich, 59 bis 63 % der detektierten archaeellen 16S rRNA-Gene bekannten hydrogenotrophen Methanogenen zuzuordnen. Diese Gruppe von methanogenen *Archaea* wurde von der Familie der *Methanomicrobiaceae* dominiert, gefolgt von der Familie der *Methanospirillaceae* und der *Methanobacteriaceae* (s. Tabelle 30 und III.1.1; Abbildung 8 und Tabelle 24). Zusätzlich konnten aufgrund der 16S rRNA-basierten Klonbibliothek 15 bis 22 % der mittels T-RFLP-Analyse detektierten 16S rRNA-Gene den acetoklastischen *Methanosaetaceae* mit *Methanosaeta concilii* als nächsten Verwandten zugeordnet werden (Tabelle 24). *Methanosaetaceae* und *Methanomicrobiales* dominierten auch die archaeellen Gemeinschaften in Sedimenten von anderen meso- bis eutrophen Süßwasserseen, wie den Biwa-See in Japan (Koizumi et al., 2003b), den Soyang-See in Südkorea (Go et al., 2000) und den Dagowsee in Deutschland (Glissmann et al., 2004). Im eutrophen Rotsee in der Schweiz wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gezeigt, dass *Methanosaeta* spp. im Mittel 91 % der archaeellen Gemeinschaft repräsentierten (Zepp-Falz et al., 1999). Trotz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden deuten alle diese Studien darauf hin, dass *Methanomicrobiales* und *Methanosaetaceae* die am weitest verbreiteten *Archaea* in Sedimenten von Süßwasserseen darstellen. Das häufige Vorkommen von *Methanomicrobiales* und *Methanosaeta* spp. könnte auf deren Rolle als effiziente syntrophe Partner (Entfernung von Wasserstoff und Acetat) im anaeroben Abbau von organischem Material in Süßwasserseesedimenten hinweisen. Interessanterweise wurden *Methanosarcina* spp. im Gegensatz zu *Methanosaeta* spp. nur selten in Sedimenten von Süßwasserseen detektiert. Da Acetat in Sedimenten von Süßwasserseen gewöhnlich in sehr geringen Konzentrationen vorliegt und der K_m -Wert für Acetat von *Methanosaeta* unter dem von *Methanosarcina* liegt (Jetten et al., 1990), kann *Methanosaeta* *Methanosarcina* in der Konkurrenz um das Acetat in Süßwasserseesedimenten bezwingen.

Die abundanteste bakterielle Gruppe, die im Profundalsediment des See Genezareth mittels 16S rRNA-Gen-gestützter T-RFLP-Analyse detektiert werden konnte, wurde den *Proteobacteria* zugewiesen (24-57 %). Die *Proteobacteria* wurden bereits mehrfach als

eine der dominantesten bakteriellen Gruppe in Süßwasserseesedimenten beschrieben, z. B. mittels FISH von drei oligo- bis eutrophen Reservoirs (Wobus et al., 2003) und mittels vergleichender 16S rRNA-gestützter Sequenzanalyse der Sedimente zweier flacher eutropher Seen (Miskin et al., 1999; Tamaki et al., 2005). In den bakteriellen T-RFLP-Mustern des Profundalsediment des See Genezareth waren die *Deltaproteobacteria* die abundanteste Gruppe innerhalb dieses Phylums, gefolgt von den *Gammaproteobacteria*, den *Betaproteobacteria* und den *Alphaproteobacteria* (Tabelle 30). Während die *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria* eher die vorherrschenden Taxa im Wasserkörper darstellen (Spring et al., 2000), wurde die große Dominanz der *Deltaproteobacteria* in Sedimenten von Süßwasserseen schon zuvor beobachtet (Miskin et al., 1999; Spring et al., 2000; Tamaki et al., 2005). Zu den abundantesten Gruppen innerhalb der *Deltaproteobacteria* im Profundalsediment des See Genezareth zählten strikt anaerobe Mikroorganismen wie syntrophe Bakterien (*Syntrophus* spp.; 9-15 %) und sulfatreduzierende Bakterien (SRB) (*Desulfobacteraceae* und *Syntrophobacteraceae*; 3-5 % bzw. 2-4 % (s. Tabelle 30 und III.1.3; Abbildung 10 und 11). In der Anwesenheit eines wasserstoffverbrauchenden Methanogenen oder SRB sind *Syntrophus* spp. in der Lage Energie aus der anaeroben Oxidation organischer Säuren zu Acetat und Kohlendioxid zu gewinnen (Wallrabenstein et al., 1995). Für *Syntrophus gentianae* wurde zudem gezeigt, dass es eine syntrophe Beziehung mit dem hydrogenotrophen *Methanospirillum hungatei* (Wasserstoffentfernung) und dem acetoklastischen *Methanosaeta concilii* (Acetatentfernung) eingehen kann (Schöcke und Schink, 1997). Da einige der in dieser Arbeit erzeugten 16S rRNA-Gen-Sequenzen nah verwandt zu diesen Spezies waren, ist eine vergleichbare syntrophe Beziehung dieser Mikroorganismen auch im Profundalsediment des See Genezareth vorstellbar. Daneben sind zusätzlich Interaktionen mit bakteriellen Partnern denkbar, da auch 16S rRNA-Gen-Sequenzen von Bakterien detektiert wurden, die ebenfalls Acetat und Wasserstoff nutzen können, wie z. B. die SRB. Die mit SRB-verwandten Klonsequenzen waren entweder mit *Desulfovirga adipica* TSU AS1 (2- 4 %) aus der Familie der *Syntrophobacteraceae* verwandt oder gruppierten in der Familie der *Desulfobacteraceae* (3-5 %) (s. Tabelle 30 und III.1.3; Abbildung 11). Die zu den *Desulfobacteraceae* verwandten Klonsequenzen waren entweder am nächsten zu einer Sequenz eines sulfatreduzierenden Endosymbionten des marinen Oligochaeten *Olavius algavensis* (Dubilier et al., 2001), zu *Desulfobacterium indolicum* oder zu *Desulfobacterium anilini* verwandt. Diese Vertreter der SRB zählen alle zu den vollständigen Oxidierern, die Fettsäuren, insbesondere Acetat, bis zu Kohlendioxid

oxidieren können. Da im Profundalsediment des See Genezareth keine bakteriellen Sequenzen unvollständig oxidierender SRB detektiert wurden, die ihr Substrat nur bis zum Niveau von Acetat oxidieren, scheint die Sulfatreduktion im Profundalsediment des See Genezareth nicht zur Acetatproduktion beizutragen. Da die Sulfatreduktion im See Genezareth mehr durch die Verfügbarkeit organischen Materials als durch die Sulfatkonzentration limitiert wird (Hadas und Pinkas, 1995), könnte die hohe Abundanz acetatoxidierender SRB bedeuten, dass die acetoklastischen Methanogenen bei Anwesenheit ausreichender Mengen an Sulfat im Sediment der direkten Konkurrenz der SRB um Acetat ausgesetzt sind.

Die zweit häufigste bakterielle Gruppe wurde dem *Bacteroidetes*-Phylum zugeordnet (8-19 %) (s. Tabelle 30 und III.1.3; Abbildung 10 und 12). Die *Bacteroidetes* sind eine phylogenetisch diverse Gruppe von Bakterien, die eine bedeutende ökologische Rolle als hydrolytische und fermentative am anaeroben Abbau von Biopolymeren beteiligte Bakterien in vielen anaeroben Habitaten einschließlich Süßwasserseesedimenten spielen (Rosselló-Mora et al., 1999; Kirchman, 2002). Daher zählen sie neben den *Proteobacteria* zu einer der abundantesten Gruppen innerhalb der heterotrophen Bakterien in aquatischen Habitaten (Kirchman, 2002).

Die hohe Abundanz von Mitgliedern der *Deltaproteobacteria* und des *Bacteroidetes*-Phylums im Profundalsediment des See Genezareth wurde zusätzlich durch den Vergleich mit 16S rRNA-gestützten Analysen der bakteriellen Gemeinschaft bestätigt, die zum Zeitpunkt Null der Inkubationsexperimente durchgeführt wurden (s. III.3.2 und III.4.2). Da der RNA-Gehalt einer mikrobiellen Gruppe in einer Probe neben dem Hinweis auf deren Populationsgröße auch ein Maß für deren Aktivität ist (Kemp et al., 1993; Molin und Givskov, 1999), demonstrierten die 16S rRNA-basierten Analysen außerdem die hohe metabolische Aktivität dieser beiden Gruppen im Profundalsediment. Somit stellten die auf Basis von 16S rRNA-Genen als abundante Gruppen detektierten Bakterien auch die metabolisch aktiven Populationen im Profundalsediment dar.

Die Anwesenheit phototropher grüner Schwefelbakterien-verwandter 16S rRNA-Gene (*Chlorobiaceae*) im dunkeln Profundalsediment war dagegen unerwartet. Tote Zellen der *Chlorobiaceae* waren möglicherweise vom Bakterioplankton sedimentiert (Ostrovsky und Yacobi, 1999). Da genomische DNA von toten Zellen sehr stabil sein kann, könnte ihre DNA für einen längeren Zeitraum überdauern haben (Ogram et al., 1987; Coolen und Overmann, 1998). *Chlorobiaceae* wurden jedoch auch mit hoher Abundanz im Sediment des kleinen salzhaltigen meromiktischen Kaiike-See nachgewiesen (Koizumi et al., 2004).

Des Weiteren zeigten Siverag und Ormerod (1977), dass „*Chlorobium thiosulfatophilum*“ mittels Energiegewinnung durch den Abbau intrazellulärer Polyglukose im Dunkeln überleben kann. Hier handelte es sich jedoch höchst wahrscheinlich nicht um metabolisch aktive Zellen, denn in keiner der 16S rRNA-gestützten Analysen der bakteriellen Gemeinschaft (s. III.3.2.3 und III.4.2.2) wurde mit *Chlorobiaceae*-verwandte RNA nachgewiesen.

Das 62-bp-T-RF war das einzige, das eine Veränderung in seiner relativen Häufigkeit zwischen den T-RFLP-Profilen der drei Sedimentproben zeigte. Die höchste Abundanz wurde in der Probe vom Januar 2003 (s. Tabelle 30 und III.1.3; Abbildung 10 und 12) detektiert. Klonsequenzen vom Profundalsediment, die dieses T-RF repräsentierten, wurden der Subdivision II innerhalb der *Chloroflexi* (Hugenholtz et al., 1998a) mit *Dehalococcoidetes ethenogenes* als nächstem Verwandten zugeordnet. *D. ethenogenes* ist fähig, unter der Verwendung von Wasserstoff als alleinigem Elektronendonator den Prozess der reduktiven Dechlorierung (Dehalorespiration) durchzuführen (Maymó-Gatell et al., 1997). Die Subdivision II wird hauptsächlich von Umweltklonsequenzen aus mit chlorierten Kohlenwasserstoffen kontaminierten Faultürmen und Sedimenten repräsentiert. Dies deutet darauf hin, dass alle Mitglieder dieser Subdivision II chlorierte Kohlenwasserstoffe dechlorieren können. Die höhere Abundanz Subdivision II-verwandter bakterieller 16S rRNA-Gene in der Sedimentprobe des Profundalsediments des See Genezareth vom Januar 2003, könnte auf die ungewöhnlich starken Regenfälle im Winter 2002/2003 zurückzuführen sein. Die Regenfälle führten zu einem Anstieg des Wasserstands um etwa 5 m, wodurch es zu einer Überflutung des bewachsenen Uferbereichs und somit zum Eintrag an Schadstoffen in den See kam (Jahresbericht 2003 des Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory).

Zusammenfassend hat die molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft gezeigt, dass *Deltaproteobacteria*, insbesondere Sulfatreduzierer und Syntrophe, die vorherrschende bakterielle Gruppe in den anoxischen Sedimentschichten des See Genezareth repräsentieren. Die archaeelle Gemeinschaft wurde, wie bereits für andere Süßwasserseesedimente beschrieben, von *Methanomicrobiales* und *Methanosaeta* spp. dominiert, die höchst wahrscheinlich als hydrogenotrophe bzw. acetoklastische Methanogene im Profundalsediment fungierten. Diese Beobachtungen hoben erneut die Bedeutung der Sulfatreduktion, der Syntrophie und Methanogenese als bedeutende Funktionen der mikrobiellen Gemeinschaft in anoxischen Sedimenten von Süßwasserseen hervor.

2. Methanogenese im Profundalsediment des See Genezareth

Die Methanogenese und die Sulfatreduktion stellen die beiden bedeutendsten terminalen elektronenakzeptierenden Prozesse im anaeroben Abbau von organischem Material in Sedimenten von Süßwasserseen dar. Hoher Eintrag an organischem Material in das Sediment kann jedoch schnell zu einer Erschöpfung des Sulfats führen. Unter diesen Bedingungen, die durch die Abwesenheit anorganischer Elektronenakzeptoren charakterisiert werden, zählt dann die Methanogenese als terminaler Hauptprozess im anaeroben Abbau von organischem Material.

In anoxischen Seesedimenten tragen Acetat bzw. H_2/CO_2 meistens in einem Verhältnis von 2:1 oder höher zur Produktion von Methan bei (Conrad, 1999). Ein erhöhter Anteil acetoklastischer Methanogenese wurde auch für das Profundalsediment des See Genezareth zwischen Januar 2003 und Oktober 2004 bestimmt. Die Zugabe geringer Pulse ($0,173 \mu\text{mol}$) von $[2-^{14}\text{C}]$ -Acetat zu Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments und die anschließende Inkubation bei *in situ* Temperatur von 15°C resultierten in einem RI-Wert von 0,17, d. h. 83 % des Methans wurden durch acetoklastische Spaltung aus der Methylgruppe des Acetats gebildet. Ein hoher Anteil acetoklastischer Methanogenese bei niedriger *in situ* Temperatur wurde bereits vielfach für andere Seesedimente beschrieben (Whiticar et al., 1986; Thebrath et al., 1993; Schulz et al., 1997; Purdy et al., 2002; Glissmann et al., 2004). Dies steht jedoch im Widerspruch zu früheren Studien über die Methanbildung im Profundalsediment des See Genezareth (Nüsslein et al., 2001; Nüsslein et al., 2003). In diesen Studien wurde mit Hilfe von $[2-^{14}\text{C}]$ -Acetat und $[^{14}\text{C}]$ -Bicarbonat gezeigt, dass bei der *in situ* Temperatur von 15°C 30-60 % der Methylgruppe des Acetats zu Kohlendioxid oxidiert wurden und 30-50 % des gebildeten Methans aus Kohlendioxid stammten. Eine Erklärung für diesen Unterschied in der Acetatumsetzung zwischen 1999 (frühere Studie; Nüsslein et al., 2001) und 2003 (diese Arbeit) könnten Veränderungen biogeochemischer Parameter des Profundalsediments darstellen, die durch die ungewöhnlich starken Regenfälle im Winter 2002/2003 verursacht worden waren. Zu diesem Zeitpunkt stieg der Wasserspiegel des Sees um ungefähr 5 m an, wodurch große Zonen des bewachsenen Uferbereichs vollständig überflutet wurden. Das vom Uferbereich in den See eindringende Wasser enthielt große Mengen an Nährstoffen und Verunreinigungen, die zu vielen Veränderungen sowohl biologischer als auch chemischer Parameter des Sees führten (Jahresbericht 2003 des Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory). In anaerob inkubiertem Reisfeldboden, wurde ein durch eine

Temperaturerhöhung verursachter Wechsel im Bildungsweg des Methans von einer Veränderung der Struktur der archaeellen Gemeinschaft des Bodens begleitet (Fey und Conrad, 2000). Der hier detektierte Wechsel von hydrogenotropher Methanogenese als dominierenden terminalen Schritt hin zu acetoklastischer Methanogenese zwischen 1999 und 2003, könnte sich daher auch in einer Veränderung der Struktur der archaeellen Gemeinschaft des Profundalsediments wiedergespiegelt haben. Ein Vergleich der archaeellen 16S rRNA-Gen-basierten T-RFLP-Muster von 1999 mit denen von 2003 konnte jedoch weder Unterschiede in der Zusammensetzung noch in der relativen Abundanz der detektierten T-RFs aufdecken (Abbildung 40 A und B).

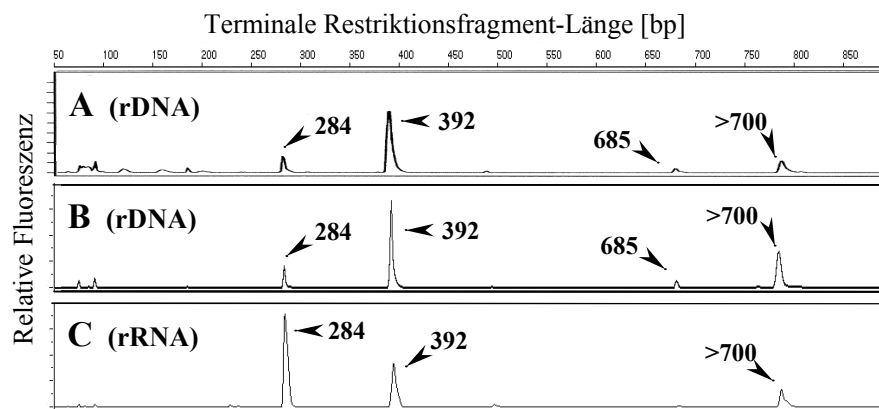


Abbildung 40: Vergleich der Struktur der archaeellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth basierend auf T-RFLP-Analysen archaeeller 16S rRNA-Gene (rDNA) in einer Sedimentprobe von 1999 (Nüsslein et al., 2001) und von 2003 (B) sowie revers-transkribierter 16S rRNA (rRNA) in einer Sedimentprobe von 2003 (C) nach Restriktion mit *TaqI*. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für das Profundalsediment des Dagowsees gemacht (Glissmann et al., 2004). Inkubationen des Sediments bei verschiedenen Temperaturen führten zwar zu einer Verschiebung der Anteile acetoklastischer und wasserstoffabhängiger Methanogenese, es konnte jedoch keine grundlegende Veränderung in der Zusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft mittels 16S rRNA-Gen-gestützter T-RFLP-Analyse nachgewiesen werden. Die veränderten Inkubationsbedingungen beeinflussten somit vielmehr die Aktivität als die Struktur der archaeellen Gemeinschaft. Die Charakterisierung der aktiven archaeellen Populationen im Profundalsediment erfolgte daher durch Klonierung und vergleichende Sequenzanalyse revers-transkribierter archaeeller 16S rRNA aus der Sedimentprobe von 2003. Ungefähr 25 % der Klonsequenzen wurden als mit *Methanosaeta* spp.-verwandte Methanogene identifiziert (s.

III.1.1; Tabelle 24). Dies deutete auf die Anwesenheit acetoklastischer Methanogener mit einer hohen Konzentration an ribosomaler RNA im Profundalsediment des See Genezareth hin. Eine zusätzliche 16S rRNA-gestützte T-RFLP-Analyse der archaeellen Gemeinschaft bestätigte, dass die relative Abundanz des für die *Methanosaeta* spp.-charakteristischen T-RFs (284 bp) im 16S rRNA-basierten T-RFLP-Muster höher als die relative Abundanz des für die Hydrogenotrophen charakteristischen T-RFs (392 bp) war (Abbildung 40 B und C).

Die Profundalsedimente tiefer Seen sind gewöhnlich durch verhältnismäßig konstante Umweltbedingungen charakterisiert. Das Profundalsediment des See Genezareth besitzt eine relativ konstante Temperatur von ungefähr 15°C über das ganze Jahr. Trotz dieser Stabilität der Temperatur wurden saisonale Veränderungen in der Methanemission aus dem Sediment beobachtet (Ostrovsky, 2003). Ostrovsky (2003) detektierte die größte Menge an Methanblasen zwischen Juli und November. Es wurde vermutet, dass die Sedimentation von organischen Partikeln und deren Abbau im Sediment eine Erhöhung der Methanproduktionsrate und eine Lagerung der gebildeten Gase im Sediment verursachte. Die simulierte Sedimentation von Algenbiomasse (*P. gatunense*) auf Sedimentkerne des Profundalsediments konnte diese Vermutung bestätigen und demonstrierte, dass die Methanogenese im Profundalsediment des See Genezareth, wie auch in anderen Seen (Schulz und Conrad, 1995; Namsaraev et al., 1995; Zepp-Falz et al., 1999), durch sedimentierendes organisches Material besonders innerhalb der oberen Sedimentschichten stimuliert werden konnte (s. III.2.2.4; Abbildung 16). Die nach der Algenzugabe erhöhten Konzentrationen von Propionat und Acetat innerhalb der oberen 0-2 cm deuteten zusätzlich darauf hin, dass Propionat und vor allem Acetat zu den zentralen Intermediaten im anaeroben Abbau der Algenbiomasse zu Methan im Profundalsediment des See Genezareth zählten (s. III.2.2.4; Abbildung 16). Neben der starken Abnahme des Wasserspiegels des See Genezareth während der Sommermonate und der damit verbundenen Abnahme des hydrostatischen Drucks, die zu einer Ausdehnung von Gasreservoirs im Sediment führen kann (Ostrovsky, 2003), könnte daher auch die erhöhte Methanproduktion nach der Sedimentation von *P. gatunense* zwischen Mai und Juni als Grund für die Gasemissionen in das darüber liegende Wasser angesehen werden.

Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Methanogenese in Sedimenten von Süßwasserseen haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer Erhöhung des Anteils der wasserstoffabhängigen Methanbildung führen kann (Schulz und Conrad, 1996; Nüsslein und Conrad, 2000; Glissmann et al., 2004). Schulz und Conrad (1996) stellten die Hypothese auf, dass bei niedrigen Temperaturen der anaerobe Abbau von organischem

Material durch Homoacetogenese gefolgt von acetoklastischer Methanogenese dominiert wird. Bei höheren Temperaturen werden dagegen fermentierende Stoffwechselwege, syntrophe Oxidation von Fettsäuren zu Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff immer bedeutender, was dann zu dem theoretisch erwarteten Verhältnis von Acetat- und wasserstoffabhängiger Methanproduktion von 2:1 führt. Die Inkubation des Profundalsediments bei 30°C führte wie erwartet zu einer höheren Methanproduktionsrate als die bei *in situ* Temperatur bestimmte (Sander und Kalff, 1993; Thebrath et al., 1993; Schulz et al., 1997; Glissmann et al., 2004). Die Bestimmung des RI-Wertes des Profundalsediments für die Umsetzung von [2-¹⁴C]-Acetat bei Inkubation bei 30°C ergab jedoch den gleichen wie bei *in situ* Temperatur gemessenen Wert von 0,17. Die Temperaturerhöhung verursachte somit nur eine Erhöhung der Aktivität acetoklastischer Methanogener jedoch keine Veränderung in der Umsetzung des Acetats und keine Verschiebung zugunsten hydrogenotropher Methanogenese. Untersuchungen des Sediments von der Flussmündung des White Oak (North Carolina, USA) konnten ebenfalls keine Veränderung des Bildungswegs des Methans mit steigender Temperatur beobachten (Avery und Martens, 1999).

Zusammenfassend haben diese Untersuchungen gezeigt, dass Acetat sowohl das bedeutendste Zwischenprodukt im anaeroben Abbau von komplexem organischem Material als auch das bedeutendste Substrat für die Methanogenese im Profundalsediment des See Genezareth in Abwesenheit alternativer anorganischer Elektronenakzeptoren war. Des Weiteren konnte mit Hilfe der Inkubationsexperimente (RI-Werte) und mittels T-RFLP- und Sequenzanalyse basierend auf 16S rRNA gezeigt werden, dass acetoklastische *Methanosaeta*-verwandte Spezies eine wichtige Gruppe der methanogenen Population im Profundalsediment des See Genezareth seit Januar 2003 darstellten.

3. Identifizierung der aktiv acetatverwertenden mikrobiellen Populationen im Profundalsediment des See Genezareth

Acetat ist ein zentrales Zwischenprodukt im anaeroben Abbau von organischem Material im Profundalsediment des See Genezareth. Ziel dieser Arbeit war es, archaeele und bakterielle Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth zu identifizieren, die in den anoxischen Sedimentschichten an der Umsetzung von Acetat beteiligt sind. Durch die Kombination biogeochemischer Prozessmessungen mit molekularen Analysen sollte das bisherige Verständnis über die Physiologie und

Phylogenie der in diesem Habitat am terminalen Schritt des Kohlenstoffkreislaufs beteiligten Mikroorganismen erweitert werden. Eine neue Methode, die eine direkte Verknüpfung detektierter biogeochemischer Prozesse mit der Identität einzelner Mitglieder einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft erlaubt, ist das auf rRNA-basierende Stable-Isotope-Probing (RNA-SIP). In dieser Arbeit wurde erstmals RNA-SIP angewandt, um die am Acetatabbau beteiligten Mitglieder einer mikrobiellen Gemeinschaft in einem anoxischen Profundalsediment eines Süßwassersees zu identifizieren. Mit Hilfe dieses auf ^{13}C -„Tracer“ basierten kombinierten Ansatzes (GC-C-IRMS und RNA-SIP) konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil des Acetats im anoxischen Profundalsediment des See Genezareth von acetoklastischen Methanogenen (*Methanosaeta* spp.) zu Methan umgesetzt wurde und nur ein geringer Prozentsatz (ca. 4 %) zu Kohlendioxid oxidiert wurde. Trotz des geringen Anteils des durch Oxidation entstandenen Kohlendioxid konnte gezeigt werden, dass ein Teil der bakteriellen Gemeinschaft die ^{13}C -Markierung in ihre 16S rRNA eingebaut hatte.

Eine inhärente Schwierigkeit der SIP-Technik ist die Notwendigkeit, dass für eine ausreichende Inkorporation der ^{13}C -Markierung in die Nukleinsäure große Mengen des ^{13}C -markierten Substrats zu den Inkubationen hinzugefügt werden müssen, wodurch die *in situ* Verfügbarkeit des Substrats erheblich erhöht wird. In den hier durchgeführten Inkubationsexperimenten war die Acetatkonzentration ungefähr 100fach höher als die *in situ* Konzentration (s. III.2.1, Tabelle 27). Obwohl das gesamte hinzugefügte Acetat (275 μmol) über die Dauer des Inkubationsexperimentes vollständig verbraucht worden war, wurde dennoch nur eine geringe Menge der ^{13}C -Markierung in der 16S rRNA der aktiven *Bacteria* wiedergefunden. Die Problematik einer effizienten Markierung der Nukleinsäure von Mikroorganismen, die sich unter ungünstigen thermodynamischen Bedingungen befinden, wurde bereits von Lueders et al. (2004b) für den Prozess der syntrophen Propionatoxidation in geflutetem Reisfeldboden beschrieben. Die Erhöhung der *in situ* Konzentration des Substrats ist daher ein erforderlicher Kompromiss bei der Analyse mikrobieller Gemeinschaften mittels der SIP-Methode.

Die Zugabe von Acetat zu den Sedimentaufschlämmungen führte zu einer Erhöhung der Methanproduktionsrate (s. III.3.1.2; Abbildung 18). Diese Reaktion wurde bereits für andere Süßwasserseesedimente wie das des Bodensees (Schulz und Conrad, 1995), des Baldegger Sees und des Soppen Sees (Nozhevnikova et al., 1997) beschrieben. Neben dem Anstieg der Methanproduktionsrate führte die Zugabe von Acetat auch zu einer Erhöhung der Anzahl archaeeller 16S rRNA-Moleküle im Vergleich zur Anzahl bakterieller

16S rRNA-Moleküle (s. III.3.2.1; Abbildung 20). Zusätzlich demonstrierte die Dominanz des für die acetoklastischen *Methanosaeta* spp. charakteristischen 284-bp-T-RFs in allen archaeellen T-RFLP-Mustern, d. h. sowohl der „schweren“ als auch der „leichten“ Fraktionen, nach zehn- und 18-tägiger Inkubation eindeutig eine acetatinduzierte Stimulierung der Aktivität methanogener *Archaea* (s. III.3.2.2; Abbildung 21-23). Die hier diskutierten Daten reflektieren daher eher das acetoklastische Potential als die tatsächlichen *in situ* Bedingungen der anoxischen, methanogenen Sedimentschichten des Profundalsediments. Trotzdem können aufgrund der zeitlichen Veränderungen in der Physiologie und der mittels SIP-markierten mikrobiellen Populationen zwischen Tag 0 und 18 nach der Acetatzugabe Rückschlüsse auf die unter *in situ* Bedingungen ablaufenden Prozesse gezogen werden.

Die Inkubationen mit [2-¹³C]-Acetat zeigten, dass ca. 85 % des Acetats durch acetoklastische Methanogenese umgesetzt worden war (s. III.3.1.3; Abbildung 19). Anhand der ¹³C-markierten 16S rRNA konnte gezeigt werden, dass das Acetat fast ausschließlich von *Methanosaeta* spp. assimiliert wurde. Obwohl der größte Anteil der Methylgruppe des Acetats zu Methan umgesetzt worden war, wurden auch ca. 4 % ¹³CO₂ über den Zeitraum von 18 Tagen gebildet. Dies deutete darauf hin, dass neben der Umsetzung durch acetoklastische Methanogene auch ein geringer Teil des Acetats durch oxidative Prozesse umgesetzt worden war. Aufgrund der Abwesenheit anorganischer Elektronenakzeptoren unter den gewählten Inkubationsbedingungen, ist die Oxidation durch syntrophe acetatoxidierende Bakterien möglich. Die Berechnung von $\Delta G \approx -40 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Tag 4) zeigte, dass die vorherrschenden thermodynamischen Bedingungen durchaus syntrophe Acetatoxidation zugelassen hätten (Zinder, 1994; Schink, 1997; Schink und Stams, 2002). Dennoch assimilierte nur ein sehr geringer Anteil der bakteriellen Gemeinschaft das ¹³C-markierte Acetat. Der größere Anteil der bakteriellen 16S rRNA blieb unmarkiert und wurde nach der Dichtegradientenzentrifugation in den „leichten“ Fraktionen wiedergefunden (s. III.3.2.1; Abbildung 20). Der Hauptteil der bakteriellen Gemeinschaft war somit nicht aktiv am Umsatz und an der Aufnahme des Acetats beteiligt. Gleichwohl unterschieden sich sowohl nach zehn als auch nach 18 Tagen Inkubation die „schweren“ bakteriellen 16S rRNA-Templates eindeutig von den „leichten“ (s. III.3.2.2; Abbildung 24). Dieser Unterschied der Templates zwischen den „schweren“ und „leichten“ Fraktionen bedeutete, dass die in den „schweren“ Fraktionen detektierten Bakterien nur aufgrund deren spezifischer Aufnahme von Acetat dort auftraten. Zusätzlich veränderte sich auch die Zusammensetzung der ¹³C-markierten bakteriellen Population von

Tag 10 zu Tag 18. Nach zehntägiger Inkubation hatten Bakterien, die zu den *Betaproteobacteria* und zum *Nitrospira*-Phylum verwandt sind, die ^{13}C -Markierung des Acetats in ihre 16S rRNA inkorporiert. Während die zum *Nitrospira*-Phylum verwandten Bakterien auch nach 18 Tagen Inkubation wieder in den „schweren“ Fraktionen nachgewiesen wurden, verschwanden die *Betaproteobacteria* aus diesen Fraktionen. Nach 18-tägiger Inkubation wurden zusätzlich Bakterien, die am nächsten zum Candidatus Phylum „*Endomicrobia*“ verwandt sind, in den „schweren“ Fraktionen detektiert.

Keines dieser mittels ^{13}C -Markierung detektierten Bakterien ist als syntropher Acetatoxidierer bekannt. Dies kann damit zusammenhängen, dass bisher nur wenige bakterielle Spezies als syntrophe Acetatoxidierer identifiziert und beschrieben wurden. Hierzu zählen die beiden Thermophilen „*Reversibacter*“ (Zinder und Koch, 1984) und *Thermoacetogenium phaeum* (Hattori et al., 2000), die zwei Mesophilen *Clostridium ultunense* (Schnürer et al., 1996) und *Geobacter sulphurreducens* (Cord-Ruwisch et al., 1998) und ein erst kürzlich aus dem Sediment des Khadyn Soda Sees in Russland isoliertes, alkalophiles Bakterium Candidatus „*Contubernalis alkalaceticum*“ (Zhilina et al., 2005). Unter den mittels RNA-SIP detektierten Bakterien könnten sich daher bisher unbekannte syntroph acetatoxidierende Vertreter der Domäne der *Bacteria* befunden haben. Unter methanogenen Bedingungen ist die syntrophe Acetatoxidation der einzige oxidative Katabolismus, der keine exergonen Elektronenakzeptoren benötigt. Anorganische Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Sulfat, Mangan(IV)- und Eisen(III)-Oxide, die häufig in anoxischen Böden und Sedimenten gefunden werden, können aufgrund der biogeochemischen Parameter des Profundalsediments und aufgrund der hier gewählten Inkubationsbedingungen ausgeschlossen werden. Dennoch könnten andere Oxidantien, wie chlorierte Verbindungen (Holliger et al., 1998; Coates et al., 1999) und Huminstoffe (Lovley et al., 1996) als alternative Elektronenakzeptoren dienen.

Innerhalb der ^{13}C -markierten *Betaproteobacteria* wurden zum Beispiel 16S rRNA-Sequenzen detektiert, die in die Ordnungen der *Burkholderiales* und der *Rhodocyclales* fielen (s. III.3.2.3; Abbildung 25). Eine der Sequenzen, die innerhalb der *Burkholderiales* gruppierte, war am nächsten verwandt zu einer Reinkultur von *Ideonella* sp. B508-1, die die Fähigkeit zur anaeroben Oxidation von Acetat mit Chlorat als Elektronenakzeptor besitzt (Malmqvist et al., 1994). Einige der zu den *Rhodocyclales* verwandten Sequenzen gruppierten innerhalb der *Dechloromonas*-Subgruppe, deren Mitglieder alle heterotrophe, fakultative Anaerobe sind, die ihr Wachstum an die komplette Oxidation von Acetat mit Chlorat oder Perchlorat als einzigen Elektronenakzeptor koppeln können (Achenbach et

al., 2001). Anaerobe Bakterien, die die Fähigkeit zur reduktiven Dechlorierung (Dehalorespiration) (Holliger et al., 1998) bzw. zur Reduktion von (Per)chlorat unter der Verwendung von Wasserstoff oder Acetat als Elektronendonator besitzen, wurden neben einer Vielzahl der unterschiedlichsten Habitate auch in Sedimenten von Süßwasserseen nachgewiesen (Bender et al., 2004). Im Jahr 2003 wurden im Wasser des See Genezareth 19 Pestizide, unter anderem auch chlorierte Verbindungen und deren Abbauprodukte mit Konzentrationen von 0,004 bis 0,047 ppb nachgewiesen (Jahresbericht 2003 des Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory). Die Assimilation von Acetat durch dechlorierende Bakterien könnte daher in den Sedimenten des See Genezareth möglich gewesen sein. Erwähnenswert ist hierbei, dass die ^{13}C -markierten *Betaproteobacteria* hauptsächlich in den 10-Tage-Inkubationen detektiert wurden und nach 18 Tagen aus den „schweren“ Fraktionen verschwanden. Dies könnte auf die Erschöpfung chlorierter Oxidantien in den Inkubationen zurückzuführen sein, ohne die eine fortwährende ^{13}C -Markierung der 16S rRNA dieser Gruppe von Bakterien nicht gewährleistet werden konnte.

Nach 18 Inkubationstagen bestand die ^{13}C -markierte bakterielle Population hauptsächlich aus Mitgliedern des *Nitrospira*-Phylums (*Thermodesulfovibrio*-, „*Magnetobacterium*“-Gruppe) und zu einem geringeren Anteil aus Mitgliedern der *Firmicutes* und des Candidatus Phylum „*Endomicrobia*“ (s. III.3.2.3; Abbildung 26 und 27). Das *Nitrospira*-Phylum setzt sich aus einer limitierten Anzahl kultivierter Organismen mit den unterschiedlichsten metabolischen Fähigkeiten zusammen (Garrity und Holt, 2001a). Fe(III)-Reduktion wurde mit „*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*“ in Verbindung gebracht, einem magnetotaktischem Organismus, der als dominante Gruppe in den mikroaeroben Sedimentschichten des Chiemsees gefunden wurde (Spring et al., 1993). „*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*“ konnte bislang jedoch nur als Anreicherungskultur aus kalkhaltigen Sedimenten verschiedener Seen in Süddeutschland gewonnen werden (Spring et al., 1993). Die 16S rRNA von „*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*“ besaß ca. 87 % Sequenzidentität zu Sequenzen aus diesem Inkubationsexperiment. *Thermodesulfovibrio yellowstonii* und *T. islandicus*, die die größte Sequenzidentität zu den hier erzeugten Sequenzen zeigten (88 % Sequenzidentität), besitzen die Fähigkeit, oxidierte Schwefelverbindungen mit Wasserstoff als Elektronendonator zu reduzieren, wenn geringe Mengen an Acetat als C-Quelle zur Verfügung stehen (Henry et al., 1994; Sonne-Hansen und Ahring, 1999). Da jedoch keiner der erwähnten anorganischen Elektronenakzeptoren aufgrund der gewählten

Inkubationsbedingungen verfügbar war, kann keine dieser oben beschriebenen metabolischen Fähigkeiten die hohe Abundanz der *Nitrospira*-verwandten 16S rRNA-Moleküle in den „schweren“ Fraktionen erklären. Möglicherweise dienten Huminstoffe als Elektronenakzeptoren (Lovley et al., 1996). Die Fähigkeit zur Reduktion von Huminstoffen wurde bisher nur für Mikroorganismen nachgewiesen, die Fe(III) reduzieren können (Lovley et al., 1996; Coates et al., 1998). Das Modell besagt, dass auf die mikrobielle Reduktion der Huminstoffe eine abiotische Reduktion wenig zugänglicher Elektronenakzeptoren, wie unlösliche Fe(III)-Oxide, durch die Huminstoffe folgt. Denn Huminstoffe sollen die Fähigkeit besitzen, Elektronen zwischen dem huminstoffreduzierenden Mikroorganismus und dem Fe(III)-Oxid hin und her zu befördern (Lovley et al., 1996).

Das Acetat und somit die ^{13}C -Markierung könnte jedoch auch von Organismen assimiliert worden sein, die andere Verbindungen als Acetat für ihren Energiestoffwechsel genutzt haben. Wenngleich die Acetatzugabe zu einer Stimulierung der Methanogenese in diesen Inkubationen geführt hatte, wurde in den Inkubationen ohne Acetatzugabe ebenfalls Methan mit geringer Produktionsrate gebildet. Diese Hintergrundmethanproduktion muss auf den anaeroben Abbau von im Sediment vorhandenem organischem Material durch fermentierende Mikroorganismen zurückzuführen sein. Solche Mikroorganismen wären dann auch unter den Bakterien wiedergefunden worden, deren 16S rRNA ^{13}C -markiert wurde. Hierzu könnten z. B. die *Firmicutes* zählen, die nach 18 Inkubationstagen in den „schweren“ Fraktionen detektiert wurden (s. III.3.2; Abbildung 24 und Tabelle 28).

Da für dieses SIP-Experiment vollständig markiertes $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat eingesetzt wurde, um ausreichende Mengen „schwerer“ rRNA zu erhalten, könnte auch das durch acetoklastische Methanogene aus der Carboxylgruppe des Acetats gebildete $^{13}\text{CO}_2$ von CO_2 -assimilierenden Bakterien inkorporiert worden sein („Cross-feeding“). „Cross-feeding“ von $^{13}\text{CO}_2$ dürfte jedoch eher von geringer Bedeutung gewesen sein, da das Sediment aus ungefähr 50 % CaCO_3 besteht, wodurch es aufgrund von Gleichgewichtsreaktionen zwischen den verschiedenen Formen des Kohlendioxids zu einer Ausverdünnung des gebildeten $^{13}\text{CO}_2$ mit $^{12}\text{CO}_2$ aus dem Sediment gekommen sein müsste. Außerdem würde die Frage offen bleiben, welche alternativen Arten des Energiestoffwechsels überhaupt eine Assimilation von Kohlendioxid unter den strikt anaeroben und reduzierten Inkubationsbedingungen erlaubt hätten.

Neben den bereits erwähnten abundanteren T-RFs, wurden einige zusätzliche T-RFs mit geringerer Abundanz in den „schweren“ Fraktionen nach 18 Tagen Inkubation

detektiert (s. III.3.2.2, Abbildung 24; T-RF 204 bp; ca. 5 % in Fraktion C3 und C4). Die für diesen T-RF charakteristischen Sequenzen zeigten nächste Verwandtschaft zu dem erst kürzlich beschriebenen Candidatus Phylum „*Endomicrobia*“ (s. III.3.2.3; Abbildung 27) (Stingl et al., 2005), dessen Vertreter bis dahin zu dem von Hugenholtz et al. (1998a) postulierten Candidatus Phylum „Termite group I“ (TG I) gezählt wurden (Ohkuma und Kudo, 1996; Hongoh et al., 2003). Während einige Vertreter des ursprünglichen „TG I“-Phylums auch außerhalb von Termiten gefunden wurden, wurden die Mitglieder des Candidatus Phylum „*Endomicrobia*“ als obligate Endosymbionten von im Darm von Termiten lebenden Flagellaten beschrieben (Stingl et al., 2005). Da anaerobe Protozoen auch in Sedimenten von Süßwasserseen existieren, könnten die mit „*Endomicrobia*“-verwandten Bakterien aufgrund des Abweidens ^{13}C -markierter methanogener *Archaea* durch die Protozoen markiert worden sein. Interessanterweise gruppierte mit diesen ^{13}C -markierten „*Endomicrobia*“-verwandten Sequenzen eine weitere Umweltklonsequenz aus einer anderen RNA-SIP-Studie, in der syntrophe Propionatoxidation in geflutetem Reisfeldboden untersucht worden war (Lueders et al., 2004b). Diese Sequenz war bisher noch nicht eindeutig einer phylogenetischen Gruppe zugeordnet worden. Aufgrund der hier durchgeführten phylogenetischen Berechnungen scheint die Sequenz aber auch in direkter Nähe zum Candidatus Phylums „*Endomicrobia*“ zu gruppieren (s. III.3.2.3; Abbildung 27). Obwohl die Gradientenfraktionen nicht auf das Vorhandensein von „schwerer“ Protozoen rRNA hin untersucht wurden, beweisen diese Ergebnisse das große Potential von nukleinsäurebasiertem SIP, trophische Interaktionen im mikrobiellen Nahrungsnetz entschlüsseln zu können (Whiteley et al., 2006).

Zusammenfassend hat dieses als anoxische Sedimentaufschlammungen mit Profundalsediment des See Genezareth durchgeführte RNA-SIP-Experiment gezeigt, dass das hinzugefügte Acetat fast vollständig von *Methanosaeta* spp.-verwandten acetoklastischen Methanogenen umgesetzt und assimiliert wurde. Die Oxidation der Methylgruppe des Acetats spielte nur eine untergeordnete Rolle, wodurch nur ein geringer Anteil der bakteriellen Gemeinschaft ^{13}C -markiert wurde. Die ^{13}C -markierte bakterielle Population war hauptsächlich zu den *Betaproteobacteria* und dem *Nitrospira*-Phylum verwandt und zu einem geringeren Anteil auch mit dem Candidatus Phylum „*Endomicrobia*“. Welche Art des Energiestoffwechsels die Assimilation des ^{13}C in deren RNA ermöglichte, bleibt jedoch weitgehend unbekannt, da keine eindeutige Identifizierung der Phänotypen der markierten Bakterien durchgeführt werden konnte. Die phylogenetische Analyse der markierten Bakterien und die vorherrschenden

Inkubationsbedingungen deuteten jedoch darauf hin, dass syntrophe Acetatoxidation, Reduktion chlorierter Verbindungen, Reduktion von Huminstoffen, Fermentation organischen Materials oder sogar Prädatismus von ^{13}C -markierten *Methanosaeta* spp. stattgefunden haben könnten. Dieses SIP-Experiment beweist somit, dass rRNA-basiertes SIP eine sehr sensitive Methode zur Identifizierung aktiver an einem bestimmten Prozess beteiligter Mitglieder einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft ist, auch wenn diese nur einen geringen Anteil der Gesamtgemeinschaft ausmachen.

4. Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von Algenbiomasse in das Profundalsediment des See Genezareth

Die Verfügbarkeit von organischem Material ist einer der wichtigsten regulierenden Faktoren mikrobieller Aktivität (Sander und Kalff, 1993). Ein hoher Eintrag an organischem Material in das Sediment nach einer Algenblüte in Form sedimentierender Algenbiomasse führt daher zu einer Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft des Sediments und insbesondere der in den anoxischen Sedimentschichten von Süßwasserseen am anaeroben Kohlenstoffabbau beteiligten Mikroorganismen (Fitzgerald und Gardner, 1993; Goedkoop et al., 1997; Tornblom und Rydin, 1998). Bisherige Studien über den Abbau von Algenbiomasse beschränkten sich weitgehend auf Aktivitätsmessungen, Bestimmungen der Biomasse und kultivierungsabhängige Methoden, die nur vereinzelte am Abbau beteiligte Mikroorganismengruppen erfassen konnten. Die Struktur und phylogenetische Diversität der am sequenziellen Abbau der Algenbiomasse aktiv beteiligten mikrobiellen Populationen und deren temporale Veränderungen während des anaeroben Abbaus von Biomasse wurden damit jedoch nur unzureichend beschrieben.

In dieser Arbeit wurde erstmals unter Verwendung molekularbiologischer Methoden basierend auf 16S rRNA die Reaktion einer mikrobiellen Gemeinschaft auf den Eintrag von organischem Material in ein anoxisches Profundalsediment eines Süßwassersees untersucht. Damit sollten die archaeellen und bakteriellen Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth identifiziert werden, die am sequenziellen Abbau von Algenbiomasse in den anoxischen Sedimentschichten des Profundals beteiligt sind. Um temporäre Veränderungen in der Struktur der aktiv am Algenabbau beteiligten mikrobiellen Population zu untersuchen, wurde die T-RFLP- und vergleichende Sequenzanalyse basierend auf 16S rRNA eingesetzt. Daneben sollte der Einsatz ^{13}C -markierter Algenbiomasse Einblicke in den Kohlenstofffluss innerhalb des

anaeroben Nahrungsnetzes sowie eine direkte Verknüpfung biogeochemischer Prozesse mit phylogenetischen Gruppen der *Archaea* und *Bacteria* ermöglichen (RNA-SIP).

Für die Untersuchung des anaeroben Abbaus von Biomasse im Profundalsediment des See Genezareth wurde *Peridinium gatunense* herangezogen (Hickel und Pollinger, 1988), das für den Haupteintrag an organischem Material in das Profundalsediment nach dessen Blüte von Mai bis Juni verantwortlich ist (Pollinger, 1986). *P. gatunense* fällt in die Klasse der *Dinophyceae* (Dinoflagellaten), in die Ordnung der *Peridiniales*. Da *P. gatunense* wie eine Vielzahl anderer Dinoflagellaten Photosynthese durchführen kann, wird *P. gatunense* auch als Alge bezeichnet. *P. gatunense* besitzt eine feste Schale (Theca) (Abbildung 41), die hauptsächlich aus polymeren Zuckern (Glucane) besteht und arm an N und P ist (C:N:P >3000:19:1; (Zohary et al., 1998). Der Protoplast, der ca. 60 % der Zellmasse ausmacht, ist relativ nährstoffreich (C:N:P 276 :51 :1; Zohary et al., 1998).

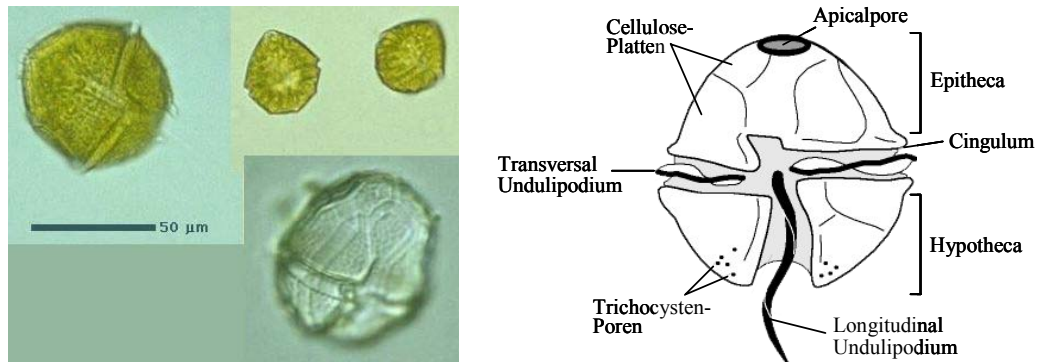


Abbildung 41: Mikroskopische Aufnahme und schematischer Aufbau von *Peridinium gatunense* (entnommen von <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Mastigophora/Peridinium/index.html>).

Der Jahreseintrag von *P. gatunense* in das Hypolimnion beträgt 187-209 g FG m⁻² y⁻¹. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um tote Zellen und Theca (Viner-Mozzini et al., 2003). Basierend auf dem C-, N-, P-Gehalt von *P. gatunense* und dem FG-TG-Umrechnungsfaktor von 2,5 (Berman, 1978) entspricht dies einer jährlichen Sedimentationsrate von 36-38 g C, 2,6-4,9 g N und 0,14-0,25 g P pro m² (Viner-Mozzini et al., 2003). Die hier zugesetzte Menge von 8 mg Algen-TG pro Sedimentaufschlammung (10 cm³ Sediment; Annahme: 1 cm² Oberfläche bei Kerntiefe von 10 cm) entsprach dem Jahreseintrag an *P. gatunense* in das Profundalsediment.

Die Zugabe des organischen Materials in Form von *P. gatunense*-Zellen, die das alljährliche Sedimentationsereignis der Alge zwischen Mai und Juni simulieren sollte, führte, wie in anderen Studien beschrieben, zu einer schnellen Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft (Schulz und Conrad, 1995; Goedkoop et al., 1997; Rosselló-Mora et al.,

1999; Zohary et al., 2000a). Die schnell einsetzende Produktion von Acetat, Propionat, Wasserstoff, Kohlendioxid und Methan in diesem Inkubationsexperiment könnte auf einen hohen Anteil gelösten organischen Materials („dissolved organic matter“; DOM) in der hinzugefügten Probe gefriergetrockneter *P. gatunense*-Zellen zurückzuführen gewesen sein. Bei Untersuchungen zum anaeroben Abbau von *P. gatunense* im See Genezareth wurden 50 % der hinzugefügten Algenbiomasse innerhalb der ersten drei Tage abgebaut (Zohary et al., 2000a). Enzymaktivitätsassays (Cellulase und β -Glucosidase) zeigten, dass zuerst die labilen, löslichen Bestandteile („dissolved organic matter“; DOM) der Algen umgesetzt wurden, während der Abbau der partikulären Bestandteile („particulate organic matter“; POM) erst anschließend erfolgte (Zohary et al., 2000b). Auch beim Abbau von Pflanzenmaterial war das anfängliche bakterielle Wachstum auf die Nutzung des gelösten organischen Kohlenstoffs und organischer bzw. anorganischer Nährstoffe zurückgeführt worden (Jürgens und Güde, 1990). Es kam erst später, begleitet von einer intensiven Kolonisierung des Pflanzenmaterials, zu einer Umsetzung der partikulären Bestandteile (Jürgens und Güde, 1990).

Entsprechend dem unvermittelten Anstieg der Acetat-, Propionat-, Wasserstoff-, Kohlendioxid- und Methankonzentrationen war das DOM der hinzugefügten Algenbiomasse vermutlich durch eine enge Kooperation fermentierender und syntropher wasserstoffproduzierender Bakterien sowie methanogener *Archaea* innerhalb der ersten Tage der Inkubation umgesetzt worden. Bereits nach eintägiger Inkubation mit Algenbiomasse kam es zu einer Veränderung in der Struktur der bakteriellen 16S rRNA-basierten T-RFLP-Muster. Dabei veränderte sich sowohl die Zusammensetzung der bakteriellen T-RFLP-Profile als auch die relative Häufigkeit einzelner T-RFs (s. III.4.2.1, Abbildung 32). Eine vergleichbare Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft wurde bereits in Studien über den anaeroben Abbau von Biomasse in marinen Sedimenten beobachtet (Rosselló-Mora et al., 1999; Luna et al., 2004). Mittels FISH und DGGE wurde gezeigt, dass die Algenzugabe zu einem schnellen und selektiven Anstieg in der Detektierbarkeit einzelner Bakterien führte (Rosselló-Mora et al., 1999). Sowohl Veränderungen in der Menge an verfügbarem organischem Material als auch dessen Beschaffenheit führten zu Veränderungen in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft (Luna et al., 2004). Dominiert wurde das bakterielle T-RFLP-Muster nach einem Tag Inkubation von T-RFs, die den *Desulfobacterales*, den *Syntrophobacterales* und den *Myxococcales* innerhalb der *Deltaproteobacteria* zugeordnet wurden. Das abundanteste T-RF (278 bp) wurde der Familie der *Desulfobacteraceae* mit *Desulfococcus multivorans* DSMZ 2059 (Friedrich,

2002) als nächst verwandtem Isolat zugeordnet. Da nach eintägiger Inkubation kein Sulfat im Porenwasser der Sedimentaufschlämmungen nachgewiesen werden konnte, musste die hohe relative Abundanz dieser Bakterien auf einen alternativen Stoffwechsel zurückzuführen gewesen sein. In der Abwesenheit von Sulfat oder anderen Elektronenakzeptoren können viele Sulfatreduzierer auch durch die Fermentation verschiedener organischer Substrate Energie gewinnen (Rabus et al., 2000).

Ein T-RF (297/299 bp), das erstmalig nach eintägiger Inkubation mit Algen in dem bakteriellen T-RFLP-Muster detektiert worden war, wurde dem Cluster I der *Clostridia* zugeordnet (Collins et al., 1994). Dieses Cluster beinhaltet sowohl hydrolytische (saccharolytische und proteolytische) als auch fermentierende Bakterien, was die schnelle Akkumulation von Acetat und Wasserstoff in den Sedimentaufschlämmungen nach der Algenzugabe erklären könnte. Die am nächsten verwandten Sequenzen waren Umweltklonsequenzen aus der Reishizosphäre (Lu et al., 2006) und anoxisch inkubierten Reisfeldbodenmikrokosmen (Lueders et al., 2004c). Zum Cluster I der *Clostridia* verwandte Umweltklonsequenzen sind potentiell an der Fermentation von Reisstrohhydrolyseprodukten, d. h. für die Fermentation von Kohlenhydraten in anoxischem gefluteten Reisfeldboden, beteiligt (Weber et al., 2001). Auch in Sedimenten von Süßwasserseen spielen *Clostridia* vermutlich eine wesentliche Rolle beim Abbau von organischem Material (Borsodi et al., 2003; Mallet et al., 2004).

Nach sechs Tagen veränderte sich die Struktur der aktiven bakteriellen Gemeinschaft erneut. Die aktive Population wurde von 16S rRNA dominiert (T-RF der Länge 40, 118, 215, 251, 410, 412 bp; s. Abbildung 32 und Tabelle 29), die dem Phylum der *Bacteroidetes* zugeordnet wurden (früher als *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-Gruppe oder *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*-Gruppe bezeichnet (Hugenholtz et al., 1998b; Garrity und Holt, 2001b; Kirchman, 2002). Das *Bacteroidetes*-Phylum wurde bereits vielfach als eine der dominanten Gruppen der bakteriellen Gemeinschaft von aquatischen Habitaten sowie Sedimenten von Süßwasserseen beschrieben (Kirchman, 2002). Die meisten Mitglieder dieses Phylums sind fähig Biomakromoleküle, insbesondere alle Arten von Polysacchariden und damit vermutlich auch die polymeren Zucker der Theca von *P. gatunense* abzubauen. Die „*Cytophaga*“ stellten ebenfalls eine der dominantesten bakteriellen Gruppe nach sieben und 13 Tagen Inkubation eines marinen Sediments mit Algenzugabe dar und waren maßgeblich an der Hydrolyse und Fermentation der Algenbiomasse beteiligt (Rosselló-Mora et al., 1999). In einer Studie über den Abbau von *P. gatunense* im See Genezareth wurde nach vier bis sieben Tagen Inkubation ebenfalls

eine erhöhte relative Abundanz von *Bacteroidetes*-verwandten Bakterien („*Cytophaga*“) und ein dadurch angezeigter Übergang von freilebenden zu filamentösen Bakterien, die die partikulären Bestandteile (POM) der Algen kolonisierten, beobachtet (Zohary et al., 2000b). Das verstärkte Auftreten *Bacteroidetes*-verwandter 16S rRNA nach sechstägiger Inkubation bestätigte somit die Vermutung, dass der Abbau der partikulären Bestandteile (POM) der Algen erst intensiv erfolgte, nachdem der labilere gelöste Anteil (DOM) der Algenbiomasse durch heterotrophe Bakterien wie Clostridien und Sulfatreduzierer umgesetzt worden war.

Einem weiteren T-RF (237 bp), das ebenfalls erstmalig nach sechstägiger Inkubation detektiert worden war, wurden Vertreter der Gattung *Bacteriovorax* zugeordnet. *Bacteriovorax* sind räuberische Bakterien mit einem biphasischen Lebenszyklus. Sie kommen einerseits als obligate intrazelluläre Parasiten von Gram-negativen Bakterien vor und andererseits als saprophytische Form, die in der Lage ist, auf nährstoffreichem Medium zu wachsen (Baer et al., 2000). Der Wechsel von freilebenden zu gleitenden filamentösen Formen von Bakterien des *Bacteroidetes*-Phylum könnte neben Fraßdruck durch Protozoen somit zusätzlich durch Prädatismus freilebender Gram-negativer Bakterien durch *Bacteriovorax*-verwandte Bakterien verstärkt worden sein.

Obwohl das nach sechstägiger Inkubation mit ^{13}C -markierten Algen durchgeführte RNA-SIP keinen eindeutigen Unterschied in der Zusammensetzung der T-RFLP-Muster der „schweren“ und „leichteren“ Fraktionen erkennen ließ (s. III.4.2.3; Abbildung 39) (ohne Berücksichtigung der Kontamination; s. III.4.2.3), deutete die Zunahme der relativen Abundanz einzelner T-RFs (um 1-6 %) mit zunehmender Gradientendichte darauf hin, dass Mitglieder des *Bacteroidetes*-Phylums zu diesem Zeitpunkt am Abbau der Algenbiomasse beteiligt waren. Da in den „schwersten“ der Fraktionen auch immer Spuren nicht-markierter RNA wiedergefunden werden, die PCR-bedingt bevorzugt gegenüber der geringen Konzentration an ^{13}C -markierter RNA amplifiziert werden können, benötigt man eine starke ^{13}C -Anreicherung der RNA zur Durchführung der SIP-Technik (Manefield et al., 2002a). Daher sollte auch das eingesetzte Substrat höchstmöglich ^{13}C -markiert sein. Niedrige ^{13}C -Atomprozent des Substrats resultieren in einer geringen ^{13}C -Markierung der RNA der Mikroorganismen, die das Substrat verwertet haben. Dadurch kann die prozentual gering ^{13}C -markierte RNA der Organismen, die aktiv an der Umsetzung beteiligt waren, nicht hinreichend von der nicht-markierten RNA getrennt werden. Während die Auftrennung [^{13}C]-phenolabbauender Mikroorganismen einer gemischten mikrobiellen Gemeinschaft eines Bioreaktors bereits bei einer ^{13}C -Anreicherung der RNA

von nur 12 % beobachtet werden konnte (Manefield et al., 2002a), musste die ^{13}C -Anreicherung der RNA einer phenolabbauenden Reinkultur mindestens 20 % betragen, um eine Wanderung der RNA in Richtung der „schweren“ Fraktionen zu erreichen (Manefield et al., 2002b). Mittels der in diesem Inkubationsexperiment eingesetzten Algenbiomasse, die zu 16,65 Atomprozent mit ^{13}C angereichert war, konnten hauptsächlich geringe Unterschiede in der relativen Häufigkeit einzelner T-RFs zwischen den bakteriellen T-RFLP-Mustern der „schweren“ und „leichten“ Fraktionen beobachtet werden (s. III.4.2.3; Abbildung 39). Bei diesen T-RFs, handelte es sich um solche, die wie zuvor beschrieben, entweder von Tag 1 bis Tag 6 stark in ihrer relativen Häufigkeit zugenommen hatten (T-RF der Länge 40 bp) oder erstmalig nach sechstägiger Inkubation detektiert worden waren (T-RF der Länge 118, 215, 237, 251, 412 bp). Ein einziges T-RF (215 bp) wurde ausschließlich in den „schwereren“ Fraktionen detektiert. Klonsequenzen, die dieses T-RF repräsentierten wurden dem zuckerfermentierenden und propionatbildenden *Alkaliflexus imshenetskii* aus dem *Bacteroidetes*-Phylum als nächst verwandtes Isolat zugeordnet. *Alkaliflexus imshenetskii* ist ein chemoorganotrophes Bakterium, das verschiedene Kohlenhydrate, insbesondere solche, die durch die Hydrolyse von Cellulose, Hemicellulose und anderen natürlichen Polysacchariden entstehen, fermentieren kann, wobei Propionat als Hauptprodukt der Zuckerfermentation entsteht (Zhilina et al., 2004). Da nach sechs Tagen Inkubation die höchste Menge an ^{13}C -Markierung im Propionat wiedergefunden wurde, waren die mittels RNA-SIP identifizierten *Alkaliflexus*-verwandten Bakterien vermutlich an der Bildung dieses Propionats beteiligt.

Propionat war neben Acetat das wichtigste Fermentationsprodukt im anaeroben Abbau der Algenbiomasse in den Sedimentaufschlämmungen. Dies wurde auch bei Untersuchungen des anaeroben Abbaus von Reisstroh beobachtet, das wie die Theca von *P. gatunense* aus polymeren Zuckern (Cellulose und Hemicellulose) besteht (Glissmann und Conrad, 2000). Gewöhnlich wird Propionat als Endprodukt der Primärgärung aus einer Reihe unterschiedlicher organischer Verbindungen gebildet. Hierzu zählen vor allem Zucker und Produkte, die während der Fermentation von Zuckern gebildet werden, wie Lactat, Ethanol, Succinat und Acetat. Propionat kann jedoch auch durch die Fermentation bestimmter Aminosäuren z. B. durch Mitglieder der *Clostridia* gebildet werden (Stams et al., 1998). Da bereits nach einem Tag Inkubation 16S rRNA detektiert wurde, die dem Cluster I der *Clostridia* zugeordnet wurde, das neben saccharolytischen auch proteolytische Vertreter beinhaltet (s. oben), kann neben der Fermentation von Zuckern

durch Vertreter der *Bacteroidetes* auch die Fermentation von Aminosäuren durch Mitglieder der *Clostridia* zur Bildung von Propionat beigetragen haben.

Da die Oxidation von Propionat unter methanogenen Bedingungen thermodynamisch ungünstig ist, kommt es häufig zu einer Akkumulation von Propionat, wenn die Bildungsrate nicht mit der Abbaurate im Gleichgewicht ist (Stams et al., 1998). Die Oxidation von Propionat zu Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff kann nur erfolgen, wenn die Konzentrationen von Acetat und Wasserstoff durch Acetat- und wasserstoffverbrauchende Prozesse wie die Methanogenese gering gehalten werden. Propionat kann daher nur durch ein obligates syntrophes Konsortium von Mikroorganismen abgebaut werden. Nach eintägiger Inkubation wurde eine Klonsequenz mit dem charakteristischen T-RF von 240 bp einer Umweltklonsequenz eines SIP-Experiments, das syntrophe Propionatoxidierer in einem anoxischen Reisfeldmikrokosmos identifizierte, und dem syntroph propionatoxidierendem *Syntrophobacter wolinii* innerhalb der *Deltaproteobacteria* (Boone und Bryant, 1980) als nächst verwandtes Isolat zugeordnet. Die zur Akkumulation des Acetats und Wasserstoffs leicht zeitversetzte Akkumulation des Propionats könnte daher nicht nur aus der Primärgärung stammen, sondern zusätzlich durch eine Umkehrreaktion der syntrophen Propionatoxidation gebildet worden sein. Diese weitere Möglichkeit zur Bildung von Propionat wurde bereits für den anaeroben Abbau von organischem Material (Reisstroh) in geflutetem anoxischen Reisfeldboden vorgeschlagen (Conrad und Klose, 1999; Conrad und Klose, 2000).

Die Zugabe der Algenbiomasse führte neben der Stimulierung bakterieller Populationen auch zu einer Stimulierung methanogener *Archaea* (siehe auch IV.2). Eine durch die Zugabe organischen Materials verursachte Stimulierung der Methanogenese wurde auch für andere Süßwasserseesedimente wie das des Bodensees (Schulz und Conrad, 1995), des Baikal-Sees (Namsaraev et al., 1995), des Baldegger-Sees und des Soppen-Sees (Nozhevnikova et al., 1997) beschrieben. Da die Methanproduktion direkt mit dem Start der Inkubation begann, herrschten vermutlich direkt mit Beginn der Inkubation methanogene Bedingungen in den Sedimentaufschlämmungen, bei denen die Methanogenese als Hauptprozess im anaeroben Abbau des aus der Primärgärung gebildeten Acetats zählt. Trotzdem kam es innerhalb der ersten Tage zu einer Akkumulation von Acetat. Dies wurde auch für die Anfangsphase des anaeroben Abbaus von Reisstroh in geflutetem Reisfeldboden beschrieben (Chidthaisong et al., 1999; Glissmann und Conrad, 2002). Während dieser Anfangsphase, in der die Hauptsubstrate der Fermentation höchstwahrscheinlich leicht zugängliches DOM darstellen, befanden sich

die produzierenden und konsumierenden Prozesse noch nicht im Gleichgewicht. Das Acetat wurde schneller produziert als es durch methanogene *Archaea* umgesetzt werden konnte. Tatsächlich wurden bis Tag 2 der Inkubation nur sehr geringe Mengen Methan gebildet. Die darauffolgend erhöhte Methanproduktionsrate und die Abnahme der Acetatkonzentration nach ungefähr sechs Tagen ließ auf eine Aktivierung acetoklastischer Methanogener in dieser Phase des anaeroben Abbaus schließen. Die 16S rRNA-basierte T-RFLP-Analyse der archaeellen Gemeinschaft bestätigte diese Vermutung. Während nach einem Tag Inkubation mit Algen keine Veränderung in der relativen Häufigkeit der T-RFs detektiert werden konnte, nahm von Tag 1 bis Tag 6 die relative Abundanz des für die acetoklastischen *Methanosaeta* spp.-charakteristischen T-RFs von 49 auf 62 % zu. Mittels RNA-SIP wurden nach eintägiger Inkubation mit ^{13}C -markierten Algen nach der Dichtegradientenzentrifugation geringe Mengen archaeeller 16S rRNA in den „schweren“ Fraktionen detektiert. Dies bestätigte die bereits beschriebene Stimulierung der archaeellen Gemeinschaft durch die Algenzugabe. Trotzdem wiesen die archaeellen T-RFLP-Muster der „schweren“ und „leichten“ Fraktionen sowohl in der Zusammensetzung als auch in der relativen Häufigkeit einzelner T-RFs keine Unterschiede auf (s. III.4.2.3; Abbildung 38). Wie bereits für die *Bacteria* diskutiert, waren die ^{13}C -Atomprozent des bis zu diesem Zeitpunkt durch die acetoklastischen Methanogenen assimilierten Acetats vermutlich nicht ausreichend hoch, um eine effiziente Trennung der markierten RNA von der nicht-markierten zu ermöglichen.

Die Hydrolyse von Biopolymeren wird gewöhnlich als der limitierende Schritt im anaeroben Abbau von organischem Material zu Methan angesehen (Billen, 1982). Während der Anfangsphase dieses Inkubationsexperiments zählte die Hydrolyse jedoch nicht zum ratenlimitierenden Schritt für die Methanogenese. Vielmehr trug die unzureichende Aktivität acetoklastischer Methanogener zu der limitierten Methanbildung selbst bei, die ihrerseits eine Akkumulation von Acetat verursachte. In der nächsten Phase, die durch maximale Methanproduktionsraten charakterisiert war, kam es durch die Zunahme der acetoklastischen Aktivität von *Methanosaeta* spp. zu einer kontinuierlichen Abnahme der Acetatkonzentration. Ab Tag 30 glichen sich die Methanproduktionsraten in den Sedimentaufschlämmungen mit Algenzugabe an die der Kontrollansätze ohne Algenzugabe an. In dieser Phase, die sich durch niedrige Acetat- und Wasserstoffkonzentrationen auszeichnete, befanden sich alle am methanogenen Abbau des organischen Materials beteiligten Prozesse vermutlich unter „Steady-State“-ähnlichen Bedingungen. Zu diesem Zeitpunkt waren alle labilen gelösten organischen Bestandteile

(DOM) umgesetzt worden und die Hydrolyse der partikulären Bestandteile (POM) wurde zum limitierenden Schritt im anaeroben Abbau des organischen Materials.

Zusammenfassend konnte mit diesem Inkubationsexperiment gezeigt werden, dass die mikrobielle Gemeinschaft des Profundalsediments des See Genezareth sehr schnell auf den Eintrag von Biomasse in Form der Alge *P. gatunense* reagierte. Die Zugabe der Algenbiomasse führte nach ein- und sechstägiger Inkubation zu massiven Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen 16S rRNA-basierten T-RFLP-Muster. Innerhalb der archaeellen T-RFLP-Muster wurde eine starken Zunahme der relativen Abundanz des für die acetoklastischen *Methanosaeta* spp. charakteristischen T-RFs detektiert als die höchsten Konzentrationen von Acetat und Propionat, den wichtigsten Intermediaten im anaeroben Abbau der Algenbiomasse, gemessen wurden. Diese Veränderungen sowohl in der Zusammensetzung als auch in der relativen Abundanz einzelner T-RFs wiesen auf temporale Veränderungen in der Aktivität bestimmter phylogenetischer Gruppen und somit auf verschiedene Phasen im anaeroben Abbau des organischen Materials hin. Nachdem das leicht zugängliche gelöste organische Material durch heterotrophe Bakterien (*Deltaproteobacteria* und *Clostridia*) innerhalb der ersten Tage umgesetzt worden war, stellte im weiteren Verlauf der Inkubation die Hydrolyse der partikulären Bestandteile den limitierenden Schritt im aeroben Abbau der Algenbiomasse dar. In Übereinstimmung mit dem Schema des anaeroben Abbaus von organischem Material kam es in dieser Phase der Inkubation zu einer verstärkten Aktivierung polymerabbauender Mitglieder des *Bacteroidetes*-Phylum, wodurch erneut Monomere für die Fermentation und schließlich Acetat für die acetoklastische Methanogenese zur Verfügung gestellt wurden. Die Detektion räuberischer *Bacteriovorax*-verwandter 16S rRNA zu diesem Zeitpunkt der Inkubation könnte die Zunahme der für filamentöse und gleitende Formen charakteristischen *Bacteroidetes*-verwandten Bakterien zusätzlich verstärkt haben.

5. Abschlussbetrachtung und Ausblick

Die in dieser Dissertation vorgelegten Untersuchungen am Profundalsediment des See Genezareth zeigten, dass die Kombination biogeochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie der Einsatz stabiler Isotope (^{13}C) als „Tracer“ ein geeigneter Ansatz für die Untersuchung komplexer Ökosysteme darstellt. Dieser Ansatz ermöglichte einen umfangreichen Einblick sowohl in die Zusammensetzung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft eines Profundalsediments eines Süßwassersees als auch in die aktiv am anaeroben Abbau von organischem Material und Acetat beteiligten bakteriellen und archaeellen Populationen in diesem Habitat.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass RNA-SIP unter Verwendung von vollständig ^{13}C -markiertem Substrat ([U- ^{13}C]-Acetat) eine sehr sensitive Methode zur Identifizierung aktiver an einem bestimmten Prozess beteiligter Mitglieder einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft darstellt. Neben einer dominanten Gruppe metabolisch höchst aktiver Mikroorganismen konnten auch solche identifiziert werden, die nur einen geringen Anteil der diversen mikrobiellen Gemeinschaft ausmachten. Die ^{13}C -Markierung von in Protozoen lebenden Bakterien ließ ein weiteres Potential von RNA-SIP erkennen, trophische Interaktionen innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes aufklären zu können. Eine Analyse „schwerer“ Dichtegradientenfractionen auf das Vorhandensein ^{13}C -markierter rRNA von Protozoen könnte daher zusätzliche Informationen über die Regulation der Räuber-Beute-Beziehungen im Nahrungsnetz von Süßwasserseesedimenten erbringen.

Der Einsatz von anteilig ^{13}C -markiertem Substrat (Algenbiomasse) resultierte nur in einer geringfügigen ^{13}C -Anreicherung der RNA der aktiven am anaeroben Abbau der Algenbiomasse beteiligten mikrobiellen Populationen. Die ^{13}C -Anreicherung bzw. die Massendifferenz dieser anteilig ^{13}C -markierten RNA war nicht ausreichend hoch, um sie von dem großen Pool nicht-markierter RNA der hoch diversen mikrobiellen Gemeinschaft vollständig mittels Dichtegradientenzentrifugation zu separieren. Eine andere häufig angewandte Methode zur Identifizierung aktiver bakterieller Populationen in „Tracer“-Studien, die im Gegensatz zu SIP unabhängig von der Separierung von Zellbestandteilen aufgrund von Massendifferenzen ist, stellt die GC-C-IRMS-Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur von PLFAs bakterieller Membranlipide dar (Boschker et al., 1998; Spring et al., 2000; Boschker und Middelburg, 2002). Diese Technik ermöglicht die Detektion der Inkorporation geringster Mengen an ^{13}C -Markierung, da mittels GC-C-IRMS sehr geringe

Unterschiede in der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopensignatur bestimmt werden können. Aufgrund der Sensitivität dieser Analysemethodik könnte daher auch die Konzentration des ^{13}C -markierten Substrats in Inkubationsexperimenten bis auf *in situ* Konzentration minimiert werden, wodurch mögliche Anreicherungseffekte während der Inkubation mit stark erhöhten Substratkonzentrationen verhindert werden könnten. Im Vergleich zu 16S rRNA-basierten Analysen erreicht diese Methode jedoch nur eine geringere Auflösung der bakteriellen Gemeinschaft und eine phylogenetische Identifizierung beschränkt sich auf solche mikrobielle Gruppen, von denen bereits PLFA-Muster von Isolaten zur Verfügung stehen. *Archaea* können aufgrund ihrer Etherlipide analysiert und identifiziert werden. Da die Etherbindungen in den Membranlipiden aber sehr stabil sind und nach dem Sterben der Zellen nur langsam abgebaut werden, geben die detektierten Etherlipide nicht zwangsläufig das aktuelle Bild der aktiven archaeellen Gemeinschaft wieder.

Die in dieser Arbeit mittels Sedimentaufschlämmungen erzielten Ergebnisse erweitern vor allem das Verständnis der sequentiell ablaufenden Phasen im anaeroben Abbau von organischem Material (Algenbiomasse) im Profundalsediment des See Genezareth. Durch den Einsatz ^{13}C -markierter Algenbiomasse konnte außerdem der Kohlenstofffluss während des anaeroben Abbaus verfolgt werden. Wasserstoff, Propionat und insbesondere Acetat stellten die zentralen Zwischenprodukte im anaeroben Abbau der Algenbiomasse (*Peridinium gatunense*) dar. Zunächst führte die Umsetzung des leicht zugänglichen gelösten organischen Materials (DOM) durch heterotrophe Bakterien (*Deltaproteobacteria* und *Clostridia*) zu einer schnellen Akkumulation von Acetat, Propionat und Wasserstoff. Mit der Akkumulation von Acetat und Propionat ging ebenfalls eine Zunahme deren ^{13}C -Atomprozent einher. Die erhöhte Verfügbarkeit von Acetat führte daraufhin zu einer Aktivierung acetoklastischer Methanogener (*Methanosaeta* spp.), was sich auch in einer Erhöhung der Methanproduktionsrate und des Anteils an $^{13}\text{CH}_4$ widerspiegelte. Tiefenprofile, die nach einem simulierten Sedimentationsereignis von *P. gatunense* auf intakte Sedimentkerne bestimmt wurden, zeigten außerdem, dass die maximalen Methanproduktionsraten in den oberen Sedimentschichten (0-2 cm) lokalisiert waren. In diesen Schichten wurden ebenfalls die höchsten Konzentrationen der zentralen Intermediate Acetat und Propionat nachgewiesen. In der nächsten Phase des anaeroben Abbaus der Algenbiomasse stellte dann die Hydrolyse der partikulären Bestandteile (POM) den limitierenden Schritt dar. Die aktive bakterielle Gemeinschaft wurde zu diesem Zeitpunkt von polymerhydrolysierenden Mitgliedern des *Bacteroidetes*-Phylums dominiert. In dieser Phase nahmen außerdem die Konzentrationen und die ^{13}C -

Atomprozent von Acetat und Propionat wieder ab, während der Anteil an $^{13}\text{CH}_4$ und $^{13}\text{CO}_2$ annähernd konstant blieb. Die Verfolgung der ^{13}C -Markierung von der Algenbiomasse über Acetat und Propionat bis hin zu $^{13}\text{CH}_4$ und $^{13}\text{CO}_2$, gab einen zusätzlichen Hinweis darauf, wie viel des organischen Kohlenstoffs während des Durchlaufens der verschiedenen funktionellen mikrobiellen Gruppen in Biomasse assimiliert worden war. Da die extrahierbare Menge an Phospholipiden als ein geeignetes Maß für die mikrobielle Biomasse in Sedimenten angesehen wird (Spring et al., 2000; Boschker und Middelburg, 2002), würde eine zusätzliche Analyse der Phospholipide eine genauere Bestimmung des in mikrobielle Biomasse assimilierten Anteils ermöglichen.

Für die euphotische Zone des See Genezareth wurden bereits mehrere Modelle des Kohlenstoffflusses durch das Nahrungsnetz erstellt (Serruya et al., 1980; Stone et al., 1993; Walline et al., 1993). Die Bedeutung des „microbial loop“ am Kohlenstofffluss in der euphotischen Zone wurde erst kürzlich aufgeklärt und in die Modellierung des Kohlenstoffbudgets des Sees miteinbezogen (Hart et al., 2000; Hadas et al., 2001). Der anaerobe Abbau von organischem Material durch die mikrobielle Gemeinschaft im Profundalsediment wurde bislang jedoch in keinem der Modelle berücksichtigt. Auf Grundlage der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse könnte ein Modell des Kohlenstoffflusses für den anaeroben Abbau von organischem Material durch die mikrobielle Gemeinschaft im Profundalsediment erstellt werden, um das bisherige Verständnis des Kohlenstoffflusses im See zu ergänzen.

V. Literatur

- Achenbach, L. A., Michaelidou, U., Bruce, R. A., Fryman, J. und Coates, J. D. 2001. *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 527-33.
- Achtnich, C., Bak, F. und Conrad, R. 1995. Competition for electron-donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. Biol. Fertility Soils. 19: 65-72.
- Amann, R. I., Ludwig, W. und Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial-cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169.
- Avery, G. B. und Martens, C. S. 1999. Controls on the stable carbon isotopic composition of biogenic methane produced in a tidal freshwater estuarine sediment. Geochim. Cosmochim. Acta. 63: 1075-1082.
- Baer, M. L., Ravel, J., Chun, J., Hill, R. T. und Williams, H. N. 2000. A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 219-224.
- Bender, K. S., Rice, M. R., Fugate, W. H., Coates, J. D. und Achenbach, L. A. 2004. Metabolic primers for detection of (per)chlorate-reducing bacteria in the environment and phylogenetic analysis of *cld* gene sequences. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5651-5658.
- Berman, T. 1978. General biochemical features. S. 269-270. In Lake Kinneret. Monogr. Biol. 32. Junk. Serruya, C. (Hrsg.).
- Berman, T., Stone, L., Yacobi, Y. Z., Kaplan, B., Schlichter, M., Nishri, A. und Pollinger, U. 1995. Primary production and phytoplankton in Lake Kinneret - a long-term record (1972-1993). Limnol. Ocean. 40: 1064-1076.
- Billen, G. 1982. Modelling the processes of organic matter degradation and nutrients recycling in sedimentary systems. S. 1552-1982. In Sediment Microbiology. Nedwell, D. B. und Brown, C. M. (Hrsg.). Academic Press. New York.

- Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S. H. und Paul, E. A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 926-932.
- Boone, D. R. und Bryant, M. P. 1980. Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov., gen. nov. from methanogenic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 626-632.
- Borsodi, A. K., Vládar, P., Čech, G., Gedeon, G., Beszteri, B., Micsinai, A., Reskone, M. N. und Marialigeti, K. 2003. Bacterial activities in the sediment of Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia*. 506: 721-728.
- Boschker, H. T. S., de Brouwer, J. F. C. und Cappenberg, T. E. 1999. The contribution of macrophyte-derived organic matter to microbial biomass in salt-marsh sediments: Stable carbon isotope analysis of microbial biomarkers. *Limnol. Ocean.* 44: 309-319.
- Boschker, H. T. S. und Middelburg, J. J. 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40: 85-95.
- Boschker, H. T. S., Nold, S. C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R. J. und Cappenberg, T. E. 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by C-13-labelling of biomarkers. *Nature*. 392: 801-805.
- Brambilla, E., Hippe, H., Hagelstein, A., Tindall, B. J. und Stackebrandt, E. 2001. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles*. 5: 23-33.
- Brand, W. A. 1996. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 31: 225-235.
- Brofft, J. E., McArthur, J. V. und Shimkets, L. J. 2002. Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. *Environ. Microbiol.* 4: 764-769.
- Bryant, M. P. 1979. Microbial methane production-theoretical aspects. *J. Anim. Sci.* 48: 193-201.
- Capone, D. G. und Kiene, R. P. 1988. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol. Ocean.* 33: 725-749.
- Cappenberg, T. E. und Prins, R. A. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a freshwater lake .1. field observations. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. 40: 285-295.

- Chan, O. C., Claus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T. und Conrad, R. 2005. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* 7: 1139-1149.
- Chidthaisong, A., Rosenstock, B. und Conrad, R. 1999. Measurement of monosaccharides and conversion of glucose to acetate in anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2350-2355.
- Chin, K.-J., Lukow, T. und Conrad, R. 1999. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2341-2349.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Blunt-Harris, E. L., Gaw, C. V., Roden, E. E. und Lovley, D. R. 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1504-1509.
- Coates, J. D., Michaelidou, U., Bruce, R. A., O'Connor, S. M., Crespi, J. N. und Achenbach, L. A. 1999. Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5234-5241.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandezgarayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. und Farrow, J. A. E. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium* - proposal of 5 new genera and 11 new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 812-826.
- Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 193-202.
- Conrad, R. und Klose, M. 1999. Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 147-155.
- Conrad, R. und Klose, M. 2000. Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 27-34.
- Conrad, R. und Schütz, H. 1988. Methods of studying methanogenic bacteria and methanogenic activities in aquatic environments. S. 301-343. *In* *Methods in Aquatic Bacteriology*. Austin, B. (Hrsg.). John Wiley & Sons Ltd.
- Coolen, M. J. L. und Overmann, J. 1998. Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4513-4521.

- Cord-Ruwisch, R., Lovley, D. R. und Schink, B. 1998. Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2232-2236.
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J. und Conrad, R. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. Arch. Microbiol. 149: 350-357.
- Costello, A. M. und Lidstrom, M. E. 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5066-5074.
- de Vries, J. J. 2005. Volume I: Introduction -theory, methods, reviews. In Environmental isotopes in the hydrological cycle: Principles and applications. Mook, W. G. (Hrsg.). <http://www.iaea.org/programmes/ripc/ih/volumes/volume1.htm>. International Atomic Energy Agency.
- Dollhopf, S. L., Hashsham, S. A. und Tiedje, J. M. 2001. Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. Microbial. Ecol. 42: 495-505.
- Dubilier, N., Mulders, C., Ferdelman, T., de Beer, D., Pernthaler, A., Klein, M., Wagner, M., Erseus, C., Thiermann, F., Krieger, J., Giere, O. und Amann, R. 2001. Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. Nature. 411: 298-302.
- Dumont, M. G. und Murrell, J. C. 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiology. 3: 499-504.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O. und Kuske, C. R. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2943-2950.
- Egert, M. und Friedrich, M. W. 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2555-2562.
- Felske, A., Engelen, B., Nubel, U. und Backhaus, H. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4162-4167.

- Ferris, M. J. und Ward, D. M. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1375-1381.
- Ferry, J. G., Smith, P. H. und Wolfe, R. S. 1974. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 465-469.
- Fey, A. und Conrad, R. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4790-4797.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- Fitzgerald, S. A. und Gardner, W. S. 1993. An algal carbon budget for pelagic-benthic coupling in Lake Michigan. *Limnol. Ocean.* 38: 547-560.
- Fogel, G. B., Collins, C. R., Li, J. und Brunk, C. F. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial. Ecol.* 38: 93-113.
- Friedrich, M. W. 2002. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* 184: 278-289.
- Garrity, G. M. und Holt, J. G. 2001a. Phylum BVIII. *Nitrospirae* phy. nov. S. 451-464. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Boone, D. R. et al (Hrsg.). Springer-Verlag. New York, USA.
- Garrity, G. M. und Holt, J. G. 2001b. The road map to the manual. S. 119-166. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Boone, D. R. et al (Hrsg.). Springer-Verlag. New York, USA.
- Gherna, R. und Woese, C. R. 1992. A partial phylogenetic analysis of the *Flavobacter-Bacteroides* phylum - basis for taxonomic restructuring. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 513-521.
- Glissmann, K., Chin, K. J., Casper, P. und Conrad, R. 2004. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: Effect of temperature. *Microbial. Ecol.* 48: 389-399.
- Glissmann, K. und Conrad, R. 2000. Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 117-126.

- Glissmann, K. und Conrad, R. 2002. Saccharolytic activity and its role as a limiting step in methane formation during the anaerobic degradation of rice straw in rice paddy soil. *Biol. Fertility Soils*. 35: 62-67.
- Go, Y. S., Han, S. K., Lee, I. G. und Ahn, T. Y. 2000. Diversity of the domain *Archaea* as determined by 16S rRNA gene analysis in the sediments of Lake Soyang. *Arch. Hydrobiol.* 149: 459-466.
- Goedkoop, W., Gullberg, K. R., Johnson, R. K. und Ahlgren, I. 1997. Microbial response of a freshwater benthic community to a simulated diatom sedimentation event: Interactive effects of benthic fauna. *Microbial. Ecol.* 34: 131-143.
- Goedkoop, W. und Johnson, R. K. 1996. Pelagic-benthic coupling: Profundal benthic community response to spring diatom deposition in mesotrophic Lake Erken. *Limnol. Ocean.* 41: 636-647.
- Gophen, M. 2000. Lake kinneret (Israel) ecosystem: Long-term instability or resiliency? *Water, Air, Soil Pollut.* 123: 323-335.
- Gophen, M. und Nishri, A. 1994. Lake Kinneret. *Arch. Hydrobiol.* 44: 65-71.
- Gray, N. D., Howarth, R., Rowan, A., Pickup, R. W., Jones, J. G. und Head, I. M. 1999. Natural communities of *Achromatium oxaliferum* comprise genetically, morphologically, and ecologically distinct subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5089-5099.
- Großkopf, R., Janssen, P. H. und Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 960-969.
- Hadas, O. und Pinkas, R. 1995. Sulfate reduction in the hypolimnion and sediments of Lake Kinneret, Israel. *Freshw. Biol.* 33: 63-72.
- Hadas, O., Pinkas, R. und Erez, J. 2001. High chemoautotrophic primary production in Lake Kinneret, Israel: A neglected link in the carbon cycle of the lake. *Limnol. Ocean.* 46: 1968-1976.
- Hart, D. R., Stone, L. und Berman, T. 2000. Seasonal dynamics of the Lake Kinneret food web: The importance of the microbial loop. *Limnol. Ocean.* 45: 350-361.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S. und Shoun, H. 2000. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1601-1609.

- Hayes, J. M. 2001. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Stable Isotope Geochemistry*. 43: 225-277.
- Head, I. M., Saunders, J. R. und Pickup, R. W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial. Ecol.* 35: 1-21.
- Henry, E. A., Devereux, R., Maki, J. S., Gilmour, C. C., Woese, C. R., Mandelco, L., Schauder, R., Remsen, C. C. und Mitchell, R. 1994. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium - *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov. - its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Arch. Microbiol.* 161: 62-69.
- Hickel, B. und Pollinger, U. 1988. Identification of the bloom-forming *Peridinium* from Lake Kinneret (Israel) as *Peridinium gatunense* (*Dinophyceae*). *Br. Phycol. J.* 23: 115-119.
- Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. und DeLong, E. F. 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*. 398: 802-805.
- Holliger, C., Wohlfarth, G. und Diekert, G. 1998. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 383-398.
- Holmer, M. und Kristensen, E. 1994. Coexistence of sulfate reduction and methane production in an organic-rich sediment. *Mar. Ecol. –Prog. Ser.* 107: 177-184.
- Hongoh, Y., Ohkuma, M. und Kudo, T. 2003. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 231-242.
- Huber, T., Faulkner, G. und Hugenholtz, P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*. 20: 2317-2319.
- Hugenholtz, P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* 3: reviews0003.1-0003.8.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. und Pace, N. R. 1998a. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. und Pace, N. R. 1998b. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180: 366-376.

- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. und Bohannon, B. J. M. 2001. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4399-4406.
- Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M. und Zehnder, A. J. B. 1990. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 339-344.
- Jurgens, G., Glockner, F. O., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolammi, M. und Munster, U. 2000. Identification of novel *Archaea* in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 45-56.
- Jürgens, K. und Güde, H. 1990. Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Mar. Ecol. –Prog. Ser.* 59: 271-284.
- Kemp, P. F., Lee, S. und Laroche, J. 1993. Estimating the growth-rate of slowly growing marine-bacteria from RNA-content. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2594-2601.
- Kirchman, D. L. 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 91-100.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M. und Schmidt, T. M. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1328-1333.
- Koizumi, Y., Kojima, H. und Fukui, M. 2003a. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 147-157.
- Koizumi, Y., Kojima, H. und Fukui, M. 2004. Dominant microbial composition and its vertical distribution in saline meromictic Lake Kaiike (Japan) as revealed by quantitative oligonucleotide probe membrane hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4930-4940.
- Koizumi, Y., Takii, S., Nishino, M. und Nakajima, T. 2003b. Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 101-108.
- Kristjansson, J. K., Schönheit, P. und Thauer, R. K. 1982. Different K_s-values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria - an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.* 131: 278-282.

- Krummen, M., Hilkert, A. W., Juchelka, D., Duhr, A., Schluter, H. J. und Pesch, R. 2004. A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2260-2266.
- Kuivila, K. M. und Lovley, D. R. 1996. Dissolved hydrogen concentrations in sulfate-reducing and methanogenic sediments. *Aquat. Hydrobiol.* 25: 55-62.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. S. 115-147. *In* Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E. und Goodfellow, M. (Hrsg.). John Wiley & Sons. New York.
- Lee, D. H., Zo, Y. G. und Kim, S. J. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120.
- Li, J. H., Purdy, K. J., Takii, S. und Hayashi, H. 1999. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 31-39.
- Lindstrom, K. 1985. Selenium requirement of the dinoflagellate *Peridiniopsis Borgei* (Lemm). *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie.* 70: 77-85.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. und Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- Lovley, D. R. 1985. Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1530-1531.
- Lovley, D. R., Coates, J. D., BluntHarris, E. L., Phillips, E. J. P. und Woodward, J. C. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature.* 382: 445-448.
- Lu, Y., Rosencrantz, D., Liesack, W. und Conrad, R. 2006. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environ. Microbiol.*
- Lüdemann, H., Arth, I. und Liesack, W. 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 754-762.
- Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I., Spring, S., Hartmann, A. und Schleifer, K. H. 1997. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 181-190.

- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. und Schleifer, K. H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*. 19: 554-568.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. und Schleifer, K. H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363-1371.
- Lueders, T. und Friedrich, M. 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2732-2742.
- Lueders, T. und Friedrich, M. W. 2002. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2484-2494.
- Lueders, T. und Friedrich, M. W. 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 320-326.
- Lueders, T., Manefield, M. und Friedrich, M. W. 2004a. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* 6: 73-78.
- Lueders, T., Pommerenke, B. und Friedrich, M. W. 2004b. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5778-5786.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P. und Friedrich, M. W. 2004c. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* 6: 60-72.
- Lukow, T., Dunfield, P. F. und Liesack, W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32: 241-247.

- Luna, G. M., Dell'Anno, A., Giuliano, L. und Danovaro, R. 2004. Bacterial diversity in deep Mediterranean sediments: relationship with the active bacterial fraction and substrate availability. *Environ. Microbiol.* 6: 745-753.
- Mallet, C., Basset, M., Fonty, G., Desvillettes, C., Bourdier, G. und Debroas, D. 2004. Microbial population dynamics in the sediments of a eutrophic lake (Aydat, France) and characterization of some heterotrophic bacterial isolates. *Microbial. Ecol.* 48: 66-77.
- Malmqvist, A., Welander, T., Moore, E., Ternstrom, A., Molin, G. und Stenstrom, I. M. 1994. *Ideonella dechloratans* gen. nov., sp. nov., a new bacterium capable of growing anaerobically with chlorate as an electron-acceptor. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 58-64.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I. und Bailey, M. J. 2002a. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5367-5373.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Ostle, N., Ineson, P. und Bailey, M. J. 2002b. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16: 2179-2183.
- Maymó-Gatell, X., Chien, Y. T., Gossett, J. M. und Zinder, S. H. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*. 276: 1568-1571.
- Miskin, I. P., Farrimond, P. und Head, I. M. 1999. Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiology*. 145: 1977-1987.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C. und Herndl, G. J. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gelelectrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3518-3525.
- Molin, S. und Givskov, M. 1999. Application of molecular tools for *in situ* monitoring of bacterial growth activity. *Environ. Microbiol.* 1: 383-91.
- Mountfort, D. O. und Asher, R. A. 1981. Role of sulfate reduction versus methanogenesis in terminal carbon flow in polluted inter-tidal sediment of Waimea Inlet, Nelson, New-Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 252-258.

- Murrell, J. C. und Radajewski, S. 2000. Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res. Microbiol.* 151: 807-814.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 317-322.
- Namsaraev, B. B., Dulov, L. E., Sokolova, E. N. und Zemskaia, T. I. 1995. Bacterial methane production in the bottom sediments of Lake Baikal. *Microbiology.* 64: 346-352.
- Nealson, K. H. 1997. Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 25: 403-434.
- Nedwell, D. B. 1984. The input and mineralization of organic-carbon in anaerobic aquatic sediments. *Adv. Microbiol. Ecol.* 7: 93-131.
- Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M. und Liesack, W. 2005. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ. Microbiol.* 7: 382-395.
- Nomura, M., Gourse, R. und Baughman, G. 1984. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 75-117.
- Nozhevnikova, A. N., Holliger, C., Ammann, A. und Zehnder, A. J. B. 1997. Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12-70°C). *Water Sci. Technol.* 36: 57-64.
- Nüsslein, B. 2000. Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung in anoxischen Standorten. Dissertation.
- Nüsslein, B., Chin, K. J., Eckert, W. und Conrad, R. 2001. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* 3: 460-470.
- Nüsslein, B. und Conrad, R. 2000. Methane production in eutrophic Lake Plusssee: seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment. *Archiv für Hydrobiologie.* 149: 597-623.
- Nüsslein, B., Eckert, W. und Conrad, R. 2003. Stable isotope biogeochemistry of methane formation in profundal sediments of Lake Kinneret (Israel). *Limnol. Ocean.* 48: 1439-1446.
- Ogram, A., Sayler, G. S. und Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods.* 7: 57-66.

- Ohkuma, M. und Kudo, T. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 461-468.
- Ostrovsky, I. 2003. Methane bubbles in Lake Kinneret: Quantification and temporal and spatial heterogeneity. Limnol. Ocean. 48: 1030-1036.
- Ostrovsky, I. und Yacobi, Y. Z. 1999. Organic matter and pigments in surface sediments: possible mechanisms of their horizontal distributions in a stratified lake. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 1001-1010.
- Pichard, S. L. und Paul, J. H. 1993. Gene-expression per gene dose, a specific measure of gene-expression in aquatic microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 59: 451-457.
- Pollinger, U. 1986. Phytoplankton periodicity in a subtropical lake (Lake Kinneret, Israel). Hydrobiologia. 138: 127-138.
- Ponnamperuma, F. N. 1972. The chemistry of submerged soils. Adv. Agron. 24: 29-96.
- Purdy, K. J., Munson, M. A., Nedwell, D. B. und Embley, T. M. 2002. Comparison of the molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of a UK estuary. FEMS Microbiol. Ecol. 39: 17-21.
- Rabus, R., Hansen, T. und Widdel, F. 2000. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes *In* Prokaryotes Life Cycles. Dworkin, M. (Hrsg.). <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>. Springer-Verlag. New York.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. und Murrell, J. C. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature. 403: 646-649.
- Raeymaekers, L. 2000. Basic principles of quantitative PCR. Mol. Biotech. 15: 115-122.
- Rosselló-Mora, R., Thamdrup, B., Schaefer, H., Weller, R. und Amann, R. 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. Syst. Appl. Microbiol. 22: 237-248.
- Rosset, R., Julien, J. und Monier, R. 1966. Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate. J. Mol. Biol. 18: 308-320.
- Rudd, J. W. M. und Hamilton, R. D. 1978. Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. Limnol. Ocean. 23: 337-348.

- Rudd, J. W. M. und Taylor, C. D. 1980. Methane cycling in aquatic environments. *Adv. Aquatic Microbiol.* 2: 77-150.
- Saitou, N. und Nei, M. 1987. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis und T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sander, B. C. und Kalf, J. 1993. Factors controlling bacterial production in marine and fresh-water sediments. *Microbial. Ecol.* 26: 79-99.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280.
- Schink, B. und Stams, A. J. M. 2002. Syntrophism among prokaryotes *In* The Prokaryotes. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>. Springer-Verlag. New York.
- Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. und von Haeseler, A. 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics.* 18: 502-504.
- Schnürer, A., Schink, B. und Svensson, B. H. 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1145-1152.
- Schöcke, L. und Schink, B. 1997. Energetics of methanogenic benzoate degradation by *Syntrophus gentianae* in syntrophic coculture. *Microbiology.* 143: 2345-2351.
- Scholten, J. C. und Conrad, R. 2000. Energetics of syntrophic propionate oxidation in defined batch and chemostat cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2934-2942.
- Schulz, S. und Conrad, R. 1995. Effect of algal deposition on acetate and methane concentrations in the profundal sediment of a deep lake (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 251-259.
- Schulz, S. und Conrad, R. 1996. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 1-14.

- Schulz, S., Matsuyama, H. und Conrad, R. 1997. Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). FEMS Microbiol. Ecol. 22: 207-213.
- Serruya, C. 1971. Lake Kinneret - nutrient chemistry of sediments. Limnol. Ocean. 16: 510-521.
- Serruya, C., Edelstein, M., Pollinger, U. und Serruya, S. 1974. Lake Kinneret sediments - nutrient composition of pore water and mud water exchanges. Limnol. Ocean. 19: 489-508.
- Serruya, C., Gophen, M. und Pollinger, U. 1980. Lake Kinneret - carbon flow patterns and ecosystem management. Arch. Hydrobiol. 88: 265-302.
- Simpson, J. M., Domingo, J. W. S. und Reasoner, D. J. 2004. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. FEMS Microbiol. Ecol. 47: 65-75.
- Sirevag, R. und Ormerod, J. G. 1977. Synthesis, storage and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum*. Arch. Microbiol. 111: 239-244.
- Sonne-Hansen, J. und Ahring, B. K. 1999. *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfobrevibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring. Syst. Appl. Microbiol. 22: 559-564.
- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Vangemerden, H. und Petersen, N. 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2397-2403.
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J. und Schleifer, K. H. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. FEMS Microbiol. Rev. 24: 573-590.
- Stackebrandt, E. und Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849.
- Stams, A. J. M., Dijkema, C., Plugge, C. M. und Lens, P. 1998. Contribution of ¹³C-NMR spectroscopy to the elucidation of pathways of propionate formation and degradation in methanogenic environments. Biodegradation. 9: 463-473.

- Stingl, U., Radek, R., Yang, H. und Brune, A. 2005. "*Endomicrobia*": Cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1473-1479.
- Stone, L., Berman, T., Bonner, R., Barry, S. und Weeks, S. W. 1993. Lake Kinneret - A Seasonal Model for Carbon Flux Through the Planktonic Biota. *Limnol. Ocean.* 38: 1680-1695.
- Suzuki, M. T., Taylor, L. T. und DeLong, E. F. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4605-4614.
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M. und Kamagata, Y. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2162-2169.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. und Ramsing, N. B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1405-1415.
- Tessenow, U., Frevert, T., Hofgaertner, W. und Moser, A. 1977. Ein simultan schließender Sedimentwasserschöpfer für Sedimentkontaktwasser mit photoelektrischer Selbstauslösung und fakultativem Sedimentstecher. *Arch. Hydrobiol.* 48: 438-452.
- Thabet, O. B., Fardeau, M. L., Joulain, C., Thomas, P., Hamdi, M., Garcia, J. L. und Ollivier, B. 2004. *Clostridium tunisiense* sp. nov., a new proteolytic, sulfur-reducing bacterium isolated from an olive mill wastewater contaminated by phosphogypse. *Anaerobe.* 10: 185-190.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. und Decker, K. 1977. Energy-conservation in chemotropic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41: 100-180.
- Thebrath, B., Rothfuss, F., Whiticar, M. J. und Conrad, R. 1993. Methane production in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Lett.* 102: 279-289.
- Tornblom, E. und Rydin, E. 1998. Bacterial and phosphorus dynamics in profundal Lake Erken sediments following the deposition of diatoms: a laboratory study. *Hydrobiologia.* 364: 55-63.
- Torsvik, V. und Ovreas, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.

- Torsvik, V., Sorheim, R. und Goksoyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *J. Ind. Microbiol.* 17: 170-178.
- Tschech, A. und Pfennig, N. 1984. Growth yield increases linked to caffeine reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 137: 163-167.
- Viner-Mozzini, Y., Zohary, T. und Gasith, A. 2003. Dinoflagellate bloom development and collapse in Lake Kinneret: a sediment trap study. *J. Plankton Res.* 25: 591-602.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B. und Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.
- Walline, P., Gophen, M. und Berman, T. 1993. The ecosystem of Lake Kinneret, Israel. S. 103-109. *In* Trophic models of aquatic ecosystems. Christensen, V. und Pauly, D. (Hrsg.). ICLARM.
- Wallrabenstein, C., Gorny, N., Springer, N., Ludwig, W. und Schink, B. 1995. Pure culture of *Syntrophus buswellii*, definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 62-66.
- Wawer, C. und Muyzer, G. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental-samples analyzed by denaturing gradient gel-electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2203-2210.
- Weber, K. A., Urrutia, M. M., Churchill, P. F., Kukkadapu, R. K. und Roden, E. E. 2006. Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ. Microbiol.* 8: 100-113.
- Weber, S., Stubner, S. und Conrad, R. 2001. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1318-1327.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. und Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Whiteley, A. S., Manefield, M. und Lueders, T. 2006. Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 67-71.
- Whiticar, M. J., Faber, E. und Schoell, M. 1986. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments - CO₂ reduction vs acetate fermentation isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 50: 693-709.

- Whittenbury, R., Phillips, K. C. und Wilkinson, J. F. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-212.
- Widdel, F. und Bak, F. 1992. Gram-negative mesophile sulfate-reducing bacteria. S. 3352-3378. *In* The Prokaryotes. Balow, A. et al (Hrsg.). Springer Verlag. New York, Berlin.
- Wobus, A., Bleul, C., Maassen, S., Scheerer, C., Schuppler, M., Jacobs, E. und Roske, I. 2003. Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 331-347.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Woese, C. R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8392-8396.
- Wolfe, R. S. 1996. 1776-1996: Alessandro Volta's combustible air. *ASM News.* 62: 529-534.
- Zehnder, A. J. B. 1978. Ecology of methane formation. *Water Pol. Microbiol.* 2: 349-376.
- Zehnder, A. J. B. und Brock, T. D. 1979. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 137: 420-432.
- Zepp-Falz, K., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A. N., Muller, B., Wehrli, B. und Hahn, D. 1999. Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2402-2408.
- Zhilina, T. N., Appel, R., Probian, C., Brossa, E. L., Harder, J., Widdel, F. und Zavarzin, G. A. 2004. *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake. *Arch. Microbiol.* 182: 244-253.
- Zhilina, T. N., Zavarzina, D. G., Kolganova, T. V., Tourova, T. P. und Zavarzin, G. A. 2005. "*Candidatus* contubernalis alkalaceticum," an obligately syntrophic alkaliphilic bacterium capable of anaerobic acetate oxidation in a coculture with *Desulfonatronum cooperativum*. *Microbiology.* 74: 695-703.
- Zinder, S. H. 1994. Syntrophic acetate oxidation and "reversible acetogenesis". S. 386-415. *In* Acetogenesis. Drake, H. L. (Hrsg.). Chapman & Hall. New York.
- Zinder, S. H. und Koch, M. 1984. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate - acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* 138: 263-272.

- Zohary, T., Erez, J., Gophen, M., Bermanfrank, I. und Stiller, M. 1994. Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food-web of Lake Kinneret. *Limnol. Ocean.* 39: 1030-1043.
- Zohary, T., Güde, H., Kaplan, A. und Pollinger, U. 2000a. Decomposition of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* under oxic vs. anoxic conditions. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 27: 879-883.
- Zohary, T., Güde, H., Pollinger, U., Kaplan, B., Pinkas, R. und Hadas, O. 2000b. The role of nutrients in decomposition of a thecate dinoflagellate. *Limnol. Ocean.* 45: 123-130.
- Zohary, T., Pollinger, U., Hadas, O. und Hambright, K. D. 1998. Bloom dynamics and sedimentation of *Peridinium gatunense* in Lake Kinneret. *Limnol. Ocean.* 43: 175-186.

Anhang A

A.1 Sequenzdaten zu III.1.2

Tabelle 31: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität archaeeller 16S rcDNA-Klone, erzeugt aus revers-transkribierten RNA-Extrakten des Profundalsediments des See Genezareth vom Januar 2003 (Klonbibliothek c2LKS) und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *TaqI*.^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	<i>TaqI</i>	nächster Verwandter ^a	„Accession number“	Sequenz-Identität ^b (%)	Referenz ^b
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanomicrobiaceae</i>	c2LKS8	AM085550	685	unidentified archeobacteria clone Rot24	Y18093	98	Zepp Falz, K. et al., 1999
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanomicrobiaceae</i>	c2LKS13	AM085537	392	uncultured archaeon clone TANA6	AY667274	99	Macbeth, T.W. et al., 2004
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanomicrobiaceae</i>	c2LKS15	AM085539	392	uncultured euryarchaeote VAL1	AJ131263	99	Jurgens, G. et al., 2000
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanomicrobiaceae</i>	c2LKS19	AM085553	392	uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> clone LrhA13	AJ879005	98	Lu, Y. und Conrad, R., 2005
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanomicrobiaceae</i>	c2LKS24	AM085547	392	uncultured <i>Methanomicrobiales</i> clone:KuA12	AB077222	96	Watanabe, K. et al., 2002
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanospirillaceae</i>	c2LKS1	AM085534	392	uncultured euryarchaeote VAL9	AJ131273	97	Jurgens, G. et al., 2000
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanospirillaceae</i>	c2LKS11	AM085535	392	uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> clone:MP-H2-B	AB236085	98	Sakai, S. et al., 2005, unveröffentlicht
<i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanospirillaceae</i>	c2LKS23	AM085546	392	Uncultured archaeon clone TANA5	AY667273	98	Macbeth, T.W. et al, 2004
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS2	AM085542	284	Uncultured archaeon clone HTA-D5	AF418933	99	Stein, L.Y. et al., 2002
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS4	AM085552	284	uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. clone KB-1 2	AY780569	99	Duhamel, M. und Edwards, E.A., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS6	AM085554	284	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS9	AM085551	284	uncultured archaeon clone:ASC10	AB161325	99	Kasai, Y. et al., 2005
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS10	AM085555	284	uncultured archaeon S15-8	AJ236489	99	Chin, K.J. et al., 2003
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS12	AM085536	284	uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. clone KB-1 2	AY780569	98	Duhamel, M. und Edwards, E.A., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS14	AM085538	284	uncultured archaeon clone:ASC10	AB161325	99	Kasai, Y. et al., 2005
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS16	AM085540	284	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS17	AM085541	284	uncultured archaeon 61-2	AF424767	98	Williams, D., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS20	AM085543	284	uncultured archaeon clone Fuku04	AF481339	99	Chan, O.C. et al., 2002
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS21	AM085544	284	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS22	AM085545	284	Uncultured archaeon clone MB-12	AY175400	99	Basiliko, N. et al., unveröffentlicht
<i>Methanosarcinales</i> <i>Methanosaetaceae</i>	c2LKS25	AM085548	284	uncultured archaeon clone:ASC10	AB161325	99	Kasai, Y. et al., 2005
<i>Euryarchaeota</i> nicht klassifiziert	c2LKS7	AM085549	580	uncultured archaeon clone E_B11	AY454676	90	Piza, F.F. et al., unveröffentlicht

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Archaea* mittels „megaBlast Search“, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

A.2 Sequenzdaten zu III.1.3

Tabelle 32: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rRNA-Gen-Klone, erzeugt aus DNA-Extrakten des Profundalsediments des See Genezareth vom Januar 2003 (Klonbibliothek c1LKS) und Juli 2003 (Klonbibliothek c5LKS) und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*.^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	<i>HaeIII</i>	nächster Verwandter ^a	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Acidobacteria</i> (<i>Holophaga</i>)	c5LKS21	AM086115	115	uncultured <i>Holophaga</i> sp., clone JG37-AG-40	AJ519370	95	Geissler, A. et al., unveröffentlicht
<i>Acidobacteria</i> (<i>Holophaga</i>)	c5LKS83	AM086150	227	Bacterial species, clone iii1-8	Z95729	84	Ludwig, W. et al., 1997
<i>Acidobacteria</i> (<i>Holophaga</i>)	c5LKS97	AM086157	254	uncultured <i>Geothrix</i> sp., clone S15B-MN21	AJ583203	93	Nedelkova, M. et al., unveröffentlicht
<i>Acidobacteria</i> (<i>Holophaga</i>)	c5LKS46	AM086131	254	<i>Geothrix fermentans</i> (T)	U41563	96	Loneragan, D.J. et al., 1996
<i>Bacteroidetes</i> <i>Flavobacteriales</i>	c1LKS42	AM086084	61	<i>Flavobacterium granuli</i>	AB180738	96	Aslam, Z. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS86	AM086153	39	uncultured bacterium, clone BIvii28	AJ318195	95	Friedrich, U. et al., 2002
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS99	AM086159	253	uncultured bacterium clone Hot Creek 27	AY168724	94	Salmassi, T.M. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS10	AM086109	254	<i>Bacteria</i> from anoxic bulk (strain XB45)	AJ229237	89	Chin, K.J. et al., 1999
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS4	AM086105	39	uncultured bacterium, clone SHA-5	AF050545	90	Dojka, M.A. et al., 1998
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS54	AM086137	39	uncultured bacterium clone PL-32B9	AF050545	91	Dojka, M.A. et al., 1998
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS74	AM086143	250	uncultured bacterium clone EuB7	AY693824	92	Boonapatcharoen, N. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS101	AM086161	250	uncultured bacterium clone EuB7	AY693824	92	Boonapatcharoen, N. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS90	AM086155	253	uncultured bacterium clone Hot Creek 27	AY168724	94	Salmassi, T.M. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c1LKS70	AM086093	260	uncultured bacterium clone A4	AY540495	96	Novak, P.J. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS44	AM086130	411	uncultured bacterium clone A4	AY540495	98	Novak, P.J. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS78	AM086147	411	uncultured bacterium clone A4	AY540495	98	Novak, P.J. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS100	AM086160	411	uncultured bacterium clone A4	AY540495	98	Novak, P.J. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS103	AM086162	411	uncultured bacterium clone A4	AY540495	98	Novak, P.J. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS32	AM086122	732	uncultured eubacterium WCHB1-53	AF050539	97	Dojka, M.A. et al., 1998
<i>Chlorobi</i> <i>Chlorobiales</i>	c5LKS19	AM086114	74	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10113	98	Overmann, J. und Tuschak, C., 1997
<i>Chlorobi</i> <i>Chlorobiales</i>	c5LKS80	AM086148	74	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10113	92	Overmann, J. und Tuschak, C., 1997
<i>Chlorobi</i> <i>Chlorobiales</i>	c1LKS37	AM086082	74	<i>Chlorobium limicola</i>	Y10113	98	Overmann, J. und Tuschak, C., 1997
<i>Chlorobi</i> nicht klassifiziert	c5LKS98	AM086158	203	uncultured bacterium clone PK329	AY555805	92	Kanokratana, P. et al., 2004
<i>Chlorobi</i> nicht klassifiziert	c5LKS28	AM086119	203	uncultured bacterium clone PK329	AY555805	91	Kanokratana, P. et al., 2004
<i>Chlorobi</i> nicht klassifiziert	c5LKS75	AM086144	227	uncultured bacterium clone PK329	AY555805	92	Kanokratana, P. et al., 2004
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcidetes</i>	c1LKS12	AM086074	62	uncultured bacterium, clone: OHKB2.40	AB094814	92	Inagaki, F. et al., 2003
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcidetes</i>	c1LKS35	AM086081	62	uncultured bacterium, clone: OHKB2.40	AB094814	92	Inagaki, F. et al., 2003
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcidetes</i>	c5LKS48	AM086133	62	uncultured bacterium, clone: OHKB2.40	AB094814	91	Inagaki, F. et al., 2003
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcidetes</i>	c5LKS38	AM086125	83	uncultured bacterium clone GIF9	AF407200	90	Alfreider, A. et al., 2002
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcidetes</i>	c5LKS53	AM086136	204	uncultured bacterium clone FS118-62B-02	AY704394	89	Huber, J.A. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	c1LKS48	AM086087	190	uncultured bacterium clone B15	AY426440	94	Roest, K. et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	c5LKS2	AM086103	212	uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone M10Ba39	AY360629	94	Lueders, T. et al., 2004

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter ^a	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	c1LKS76	AM086095	220	uncultured bacterium clone Napoli-2B-36	AY592658	92	Heijs, S.K. et al., unveröffentlicht
<i>Deferribacteres</i> (<i>Caldithrix</i>)	c5LKS36	AM086123	240	unidentified bacterium wb1_H02	AF317766	83	Holmes, A.J. et al., 2001
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	c5LKS59	AM086139	298	uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium clone M10Ba34	AY360624	99	Lueders, T. et al., 2004
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	c1LKS46	AM086085	233	uncultured bacterium clone FW114	AF524008	94	Brofft, J.E., et al., 2002
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS81	AM086149	249	uncultured planctomycete, clone DSP26	AJ290184	92	Felske, A. et al., unveröffentlicht
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	c5LKS47	AM086132	267	uncultured bacterium #0319-7F4	AF234144	87	Holmes, A.J. et al., 2000
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	c5LKS68	AM086141	83	uncultured bacterium clone 056F03_P_DI_P58	CR933066	94	Chouari, R. et al., 2005
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	c1LKS104	AM086101	178	Bacterium Ellin5102	AY234519	97	Joseph, S. J. et al., 2003
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	c5LKS30	AM086121	234	uncultured soil bacterium PBS-III-20	AJ390453	91	Derakshani, M. et al., 2001
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	c1LKS14	AM086075	248	unidentified <i>Verrucomicrobium</i> group OPB35	AF027005	87	Hugenholtz, P. et al., 1998
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	c5LKS8	AM086108	277	uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium clone LD1-PA50	AY114328	90	Freitag, T.E. et al., 2003
<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i>	c5LKS84	AM086151	39	uncultured sludge bacterium A26	AF234745	97	Juretschko, S. et al., 2002
<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i>	c5LKS85	AM086152	39	uncultured sludge bacterium A26	AF234745	97	Juretschko, S. et al., 2002
<i>Alphaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS72	AM086142	382	uncultured bacterium clone ELB16-030	DQ015802	88	Glatz, R.E. et al., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophilales</i>	c5LKS39	AM086126	221	beta proteobacterium 5Z-C1	AJ224618	96	Stubner, S. et al., 1998
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Methylophilales</i>	c1LKS61	AM086092	221	uncultured beta proteobacterium clone Elb168	AJ421928	93	Brummer, I.H. et al., 2003
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	c5LKS43	AM086129	221	clone Elb168	AJ421928	95	Brummer, I. H. et al., 2003
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	c5LKS95	AM086156	219	uncultured beta proteobacterium clone Cart-N1	AY118150	98	Ulrich, A.C. et al., 2003
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Legionellales</i>	c1LKS49	AM086088	323	<i>Legionella</i> sp. OA32	AB058916	92	Maki, T. et al., 2001
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	c1LKS56	AM086090	69	uncultured bacterium, clone D14307	AJ617834	94	Noll, M. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	c5LKS24	AM086117	69	<i>Methylocaldum</i> sp. dr65	AF215632	90	Fischer, C.M. et al., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	c5LKS3	AM086104	69	<i>Methylomonas</i> sp. LW16	AF150796	98	Costello, A.M. et al., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS13	AM086110	39	uncultured bacterium clone 125ds10	AY212576	97	Simpson, J.M. et al., 2004
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS1	AM086102	190	uncultured bacterium clone SBRQ157	AF361092	94	Crocetti, G.R. et al., 2002
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c5LKS37	AM086124	209	<i>Olavius algarvensis</i> sulfate-reducing endosymbiont	AF328857	94	Dubilier, N. et al., 2001
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c1LKS85	AM086098	209	uncultured delta proteobacterium, clone SR27	AY771945	93	Mussmann, M. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c5LKS88	AM086154	209	<i>Desulfococcus biacutus</i> , strain DSM 5651T	AJ277887	92	Hippe, H. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c5LKS104	AM086163	211	uncultured eubacterium, clone vadinHA60	U81720	91	Godon, J.-J. et al., 1997
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c1LKS39	AM086083	240	clone cLaKi-StA92	AJ582710	99	Stubner, S., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c5LKS29	AM086120	240	clone cLaKi-StA89	AJ582708	98	Stubner, S., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	c1LKS60	AM086091	277	clone cLaKi-StA87	AJ582707	96	Stubner, S., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS54	AM086089	77	uncultured bacterium, clone pLW-41	DQ067032	97	Nercessian, O.G., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS47	AM086086	77	uncultured bacterium clone TTA_H101	AY661418	94	Chen, C.L. et al., 2004
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS81	AM086097	77	uncultured bacterium, clone SHA-42	AJ306771	93	Schloetelburg, C., 2001
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS26	AM086077	205	uncultured bacterium, clone 172	AJ831750	95	Tonolla, M.A. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c5LKS58	AM086138	207	<i>Syntrophus</i> sp., Clone B2	AJ133795	98	Zengler, K. et al., 1999

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter ^a	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c5LKS17	AM086113	272	<i>Syntrophus gentianae</i>	X85132	94	Wallrabenstein, C. et al., 1995
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS88	AM086100	272	<i>Syntrophus gentianae</i>	X85132	94	Wallrabenstein, C. et al., 1995
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS79	AM086096	76	clone cLaKi-JM18	AJ582685	95	Stubner, S., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c5LKS15	AM086112	201	clone cLaKi-JM18	AJ582685	95	Stubner, S., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	c1LKS73	AM086094	238	clone cLaKi-StA58	AJ582695	95	Stubner, S., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS76	AM086145	207	uncultured bacterium, clone: KNA6-EB08	AB179687	92	Miyoshi, T. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS77	AM086146	207	uncultured bacterium, clone: KNA6-EB08	AB179687	92	Miyoshi, T. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS6	AM086107	207	uncultured bacterium, clone: KNA6-EB08	AB179687	93	Miyoshi, T. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS27	AM086118	272	uncultured delta proteobacterium Sva0485	AJ241001	93	Ravenschlag, K. et al., 1999
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c1LKS2	AM086072	206	uncultured delta proteobacterium, clone SB1-2	AB188771	93	Fang, J. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c1LKS28	AM086079	207	uncultured <i>Desulfuromonadales</i> bacterium, clone LH5_30	AY177804	98	Purdy, K.J. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c1LKS29	AM086080	207	uncultured <i>Desulfuromonadales</i> bacterium, clone LH5_30	AY177804	98	Purdy, K.J. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS67	AM086140	244	uncultured bacterium SJA-162	AJ009498	97	von Wintzingerode, F. et al., 1999
<i>Epsilonproteobacteria</i> nicht klassifiziert	c5LKS41	AM086127	950	uncultured bacterium clone RA9C8	AF407391	98	Alfreider, A. et al., 2002
Candidatus Phylum OP3	c1LKS10	AM086073	306	uncultured soil bacterium clone S042	AF507707	87	Dunbar, J. et al., 2002
Candidatus Phylum OP11	c1LKS27	AM086078	237	uncultured eubacterium WCHB1-26	AF050599	88	Dojka, M.A. et al., 1998
Candidatus Phylum OP11	c5LKS5	AM086106	396	uncultured bacterium clone B02R017	AY197399	91	Dhillon, A. et al., 2003
Candidatus Phylum TM6	c5LKS42	AM086128	186	unidentified bacterium, isolate TM21	X97102	86	Rheims, H. et al., 1996
Candidatus Phylum TM7	c1LKS1	AM086071	211	uncultured bacterium, clone 54	AJ538353	94	Tonolla, M.A. et al., unveröffentlicht
Candidatus Phylum WS3	c5LKS51	AM086134	205	uncultured delta proteobacterium	AF424217	94	Bowman, J. P. et al., 2003
Candidatus Phylum WS3	c5LKS52	AM086135	205	uncultured delta proteobacterium	AF424217	94	Bowman, J. P. et al., 2003
unbekannte Zugehörigkeit	c1LKS19	AM086076	166	uncultured Banisveld landfill bacterium BVC56	AY013695	86	Röling, W.F.M. et al., 2001
unbekannte Zugehörigkeit	c5LKS14	AM086111	205	uncultured bacterium clone: BuM1	AB218875	83	Yamada, T., et al., unveröffentlicht
unbekannte Zugehörigkeit	c1LKS86	AM086099	221	uncultured bacterium; clone:Rs-J96	AB089068	86	Hongoh, Y. et al., 2003
unbekannte Zugehörigkeit	c5LKS23	AM086116	221	uncultured bacterium; clone:Rs-J96	AB089068	86	Hongoh, Y. et al., 2003
Chloroplast	c1LKS4	—	876	uncultured diatom clone HT2F1	AF418975	87	Stein, L.Y. et al., 2001
Chloroplast	c5LKS45	—	876	uncultured diatom clone HT2F1	AF418975	97	Stein, L.Y. et al., 2001
Chloroplast	c5LKS57	—	871	<i>Haslea nipkowii</i>	AF514850	92	Poulin, M. et al., unveröffentlicht
Chloroplast	c5LKS65	—	877	uncultured diatom clone HT2F1	AF418975	97	Stein, L.Y. et al., 2001
Chloroplast	c5LKS66	—	876	uncultured diatom clone HT2F1	AF418975	97	Stein, L.Y. et al., 2001

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels „megaBlast Search“;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

A.3 Sequenzdaten zu III.3.2

Tabelle 33: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rcDNA-Klone, erzeugt aus mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten RNA-Extrakten („leichte“ Fraktion AV9 nach zehn Tagen Inkubation) und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*.^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	<i>HaeIII</i>	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Acidobacteria</i> (<i>Holophaga</i>)	AV9-68	AM181839	68	uncultured bacterium isolate JH12_C44	AY568883	96	Cho, H.Y. et al. unveröffentlicht,
<i>Acidobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-171	AM181880	77	uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone LiUU-11-191	AY506523	97	Eiler, A. und Bertilsson, S., 2004
<i>Acidobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-74	AM181843	217	Bacterium Ellin342	AF498724	94	Sait, M. et al., 2002
<i>Actinobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-76	AM181844	227	<i>Streptomyces chungwhensis</i> strain AA-98	AY382292	97	Lee, E. und Kim, C., unveröffentlicht
<i>Actinobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-146	AM181869	237	uncultured bacterium ARFS-13	AJ277692	95	Luedemann, H. und Conrad R., 2000
<i>Actinobacteria</i> (<i>Sporichyta</i>)	AV9-158	AM181875	219	uncultured bacterium clone PeM15	AJ576385	96	Egert, M. et al., 2003
<i>Actinobacteria</i> (<i>Sporichyta</i>)	AV9-115	AM181857	220	Gram-positive bacteria SOGA22	AJ244799	99	Grigioni, S. et al., 2000
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	AV9-138	AM181867	40	uncultured bacterium clone L15	AY444993	91	Cole, A.C. et al., 2004
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	AV9-1	AM181811	253	uncultured bacterium clone KD2-28	AY218581	92	Zhang, R. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	AV9-55t	AM181832	260	uncultured bacterium clone OHK2.40	AB094814	91	Inagaki et al., 2003
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	AV9-44	AM181828	910	uncultured eubacterium AA26	AF275921	91	Godon, J.-J. et al., 2000
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcoidetes</i>	AV9-10	AM181950	62	uncultured bacterium, clone: OHKB2.40	AB094814	92	Inagaki, F. et al., 2003
<i>Chloroflexi</i> <i>Dehalococcoidetes</i>	AV9-35	AM182004	62	uncultured bacterium, clone: OHKB2.40	AB094814	92	Inagaki, F. et al., 2003
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-82	AM181846	217	uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone M10Ba39	AY360629	91	Lueders, T. et al., 2004
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-2	AM181812	217	uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone M10Ba39	AY360629	96	Lueders, T. et al., 2004
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-114	AM181856	217	uncultured bacterium clone 463T3	DQ110105	99	Weber, K.A. et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-4	AM181813	219	uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone M10Ba39	AY360629	96	Lueders, T. et al., 2004
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-67	AM181838	219	uncultured bacterium SHD-43	AJ278172	91	Schloetelburg, C. et al., 2002
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-101	AM181852	221	uncultured bacterium clone C1-28	AJ387901	92	Yamada, T. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-154	AM181874	223	uncultured hydrocarbon seep bacterium GCA112	AF154100	93	O'Neill, K.R. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-89	AM181848	224	uncultured hydrocarbon seep bacterium GCA112	AF154100	92	O'Neill, K.R. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-79	AM181845	225	uncultured bacterium clone X9Ba49	AY607181	93	Lueders, T. et al., 2004
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-26	AM181821	230	uncultured hydrocarbon seep bacterium GCA112	AF154100	93	O'Neill, K.R. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV9-120	AM181860	414	uncultured bacterium clone sipK52	AJ307949	99	Rudolph, C. et al., 2001
<i>Cyanobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-43	AM181827	63	uncultured cyanobacterium clone SM1D11	AF445677	85	Bonheyo, G.T. et al., unveröffentlicht
<i>Deferribacteres</i> <i>Caldithrix</i>	AV9-133	AM181864	158	Saltmarsh clone LCP-26	AF286031	90	Kostka, J.E. et al., unveröffentlicht
<i>Deferribacteres</i> <i>Caldithrix</i>	AV9-39	AM181825	241	unidentified bacterium wb1-H02	AF317766	83	Holmes, A.J. et al., 2001
<i>Deferribacteres</i> <i>Caldithrix</i>	AV9-49	AM181829	266	unidentified bacterium wb1-H02	AF317766	85	Holmes, A.J. et al., 2001
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	AV9-152	AM181872	299	uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium clone M10Ba34	AY360624	99	Lueders, T. et al., 2004
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	AV9-170	AM181879	68	uncultured planctomycete clone C6	AY360082	84	Tal, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	AV9-174	AM181882	241	uncultured soil bacterium PBS-71	AJ390467	89	Derakshani, M. et al., 2001
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	AV9-118	AM181858	416	uncultured bacterium clone Napoli-3B-04	AY592681	88	Heijs, S.K. et al., 2004

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	AV9-71	AM181841	234	uncultured bacterium clone S-BQ2-57	DQ017935	90	Beier, S. et al., 2005
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	AV9-25	AM181820	244	uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium clone ML635J-35	AF507896	87	Humayoun, S.B. et al., 2003
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	AV9-137	AM181866	199	uncultured beta proteobacterium	AJ318109	97	Friedrich, U. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	AV9-111	AM181855	218	unidentified bacterium clone W4-B56 16S	AY345493	98	Donachie, S.P. et al., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	AV9-9	AM181815	221	uncultured bacterium isolate JH12-C98	AY568931	92	Cho, H.Y. et al. unveröffentlicht,
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophilaes</i>	AV9-54	AM181831	70	uncultured bacterium clone 191up	AY212644	99	Simpson, J.M. et al., 2004
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophilaes</i>	AV9-57	AM181834	70	uncultured bacterium clone 191up	AY212644	99	Simpson, J.M. et al., 2004
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Methylophilales</i>	AV9-119	AM181859	201	Betaproteobacterium HTCC349	AY429717	99	Connon, S.A. et al., 2005
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV9-130	AM181862	222	uncultured bacterium clone: TSAQ22	AB186828	99	Yoshida, N. und Hiraishi, A., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV9-143	AM181868	70	<i>Dechloromonas</i> sp. MissR	AB166784	96	Okamoto, M. und Onuki, M., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-58	AM181835	40	uncultured bacterium clone 125ds10	AY212576	98	Simpson, J.M. et al., 2004
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-91	AM181849	70	<i>Methylocaldum tepidum</i>	U89297	95	Bodrossy, L. und Holmes, E.M., 1997
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-94	AM181850	70	<i>Methylocaldum</i> sp. Dr65	AF215632	89	Fischer, C.M., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-153	AM181873	70	<i>Methylocaldum</i> sp. Dr65	AF215632	89	Fischer, C.M., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-148	AM181870	70	uncultured <i>Methylobacter</i> pAMC419	AF150775	97	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-110	AM181854	70	uncultured <i>Methylobacter</i> pAMC419	AF150775	95	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-23	AM181819	70	uncultured <i>Methylobacter</i> pAMC419	AF150775	95	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-132	AM181863	70	uncultured <i>Methylobacter</i> pAMC419	AF150775	97	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-97	AM181851	70	<i>Methylomonas methanica</i>	AF150806	97	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-159	AM181876	70	<i>Methylomonas</i> sp. LW16	AF150796	98	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-40	AM181826	70	<i>Methylomonas</i> sp. LW16	AF150796	98	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV9-134	AM181865	78	uncultured bacterium, clone D14307	AJ617834	96	Noll, M. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> Candidatus Competibacter	AV9-30	AM181822	112	uncultured proteobacterium clone SBRL1-8	AY098896	95	Liu, W.-T., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> Candidatus Competibacter	AV9-33	AM181824	191	uncultured bacterium clone SBRQ191	AF361091	91	Crocetti, G.R. et al., 2002
<i>Gammaproteobacteria</i> Candidatus Competibacter	AV9-50	AM181830	284	uncultured proteobacterium clone SBRL1-8	AY098896	94	Liu, W.-T., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV9-19	AM181818	189	uncultured bacterium isolate JH12-C61	AY568900	94	Cho, H.Y. et al., unveröffentlicht,
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV9-72	AM181842	204	<i>Desulfobulbus</i> sp. RPF35L17	AY548775	97	Kaksonen, A.H. et al., 2004
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV9-151	AM181871	204	uncultured delta proteobacterium clone SR27	AY771945	90	Mussmann, M. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV9-56	AM181833	210	<i>Olavius crassitunicatus</i> delta-proteobacterial endosymbiont	AJ620510	90	Blazejak, A.H. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV9-32	AM181823	210	uncultured delta proteobacterium clone SR27	AY771945	94	Mussmann, M. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	AV9-124	AM181861	204	<i>Desulforhabdus amnigenus</i>	X83274	92	Oude Elferink, S.J.W.H., et al 1995
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	AV9-172	AM181881	208	uncultured delta proteobacterium partial	AJ519663	94	Geissler, A et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Myxococcales</i>	AV9-8	AM181814	206	uncultured bacterium clone cs25	DQ088249	97	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Myxococcales</i>	AV9-86	AM181847	208	uncultured proteobacterium clone SIMO-1721	AY711087	91	Moran, M.A. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	AV9-16	AM181816	244	uncultured bacterium SHA-207	AJ249114	97	Schloetelburg, C. et al., 2000

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	<i>HaeIII</i>	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacteriales</i>	AV9-18	AM181817	896	uncultured epsilon proteobacterium clone FTL9	AF529113	98	Carroll, A.B. und Zinder, S.H., unveröffentlicht
Candidatus Phylum WS3	AV9-167	AM181877	206	uncultured bacterium clone FE2MidBac45	AY769021	90	Reed, A.J. et al., unveröffentlicht
Unbekannte Zugehörigkeit	AV9-61	AM181836	70	uncultured bacterium clone: BUM1	AB218875	89	Yamada, T., et al, unveröffentlicht
Unbekannte Zugehörigkeit	AV9-70	AM181840	206	uncultured bacterium clone: BUM1	AB218875	89	Yamada, T., et al, unveröffentlicht
Unbekannte Zugehörigkeit	AV9-63	AM181837	206	uncultured bacterium clone: BUM1	AB218875	89	Yamada, T., et al, unveröffentlicht
Unbekannte Zugehörigkeit	AV9-103	AM181853	206	uncultured bacterium clone: BUM1	AB218875	89	Yamada, T., et al, unveröffentlicht
Unbekannte Zugehörigkeit	AV9-169	AM181878	216	uncultured bacterium clone: BUM1	AB218875	89	Yamada, T., et al, unveröffentlicht
Chloroplast	AV9-129	—	322	uncultured <i>Scenedesmus</i> sp. Chloroplast	AJ387901		

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels „megaBlast Search“;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

Tabelle 34: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rcDNA-Klone, erzeugt aus mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten RNA-Extrakten („schwere“ Fraktion AV5 nach zehn Tagen Inkubation) und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*.

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	<i>HaeIII</i>	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Acidobacteria</i> <i>Holophaga</i>	AV5-26	AM181899	68	uncultured bacterium isolate JH12_C36	AY568877	94	Cho, H.Y., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV5-66	AM181933	64	uncultured bacterium clone X3Ba06	AY607109	92	Lueders, T. et al., 2004
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV5-34	AM181906	68	Uncultured bacterium clone pLW-97	DQ067036	92	Nercessian, O.G. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV5-55	AM181926	226	uncultured bacterium clone pLW-97	DQ067036	92	Nercessian, O.G. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	AV5-21	AM181895	303	uncultured bacterium clone ga04	DQ093879	96	Zu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	AV5-19	AM181894	257	<i>Termitobacter aceticus</i> (<i>Sporobacter termitidis</i>)	Z49863	95	Grech-Mora I. et al., 1996
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	AV5-58	AM181925	257	<i>Termitobacter aceticus</i> (<i>Sporobacter termitidis</i>)	Z49863	95	Grech-Mora I. et al., 1996
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	AV5-61	AM181928	301	uncultured bacterium clone p-2171-s959-3	AF371841	93	Leser T.D. et al., 2002
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-4	AM181885	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-6	AM181886	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-8	AM181887	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-12	AM181891	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-24	AM181897	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-25	AM181898	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-88	AM1819	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-29	AM181902	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-30	AM181903	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-32	AM181904	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-35	AM181907	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin, L.-H. et al., unveröffentlicht

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-37	AM181909	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-40	AM181911	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-41	AM181912	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-42	AM181913	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-45	AM181915	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-46	AM181916	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-47	AM181917	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1-34	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-48	AM181918	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-49	AM181919	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-51	AM181920	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-53	AM181922	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-54	AM181923	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-62	AM181929	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-63	AM181930	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-65	AM181932	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-73	AM181939	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-78	AM181941	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-82	AM181945	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-91	AM181952	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	AV5-104	AM181956	231	uncultured bacterium clone BE325FW032701CTS_hole1	DQ088762	92	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	AV5-71	AM181937	70	uncultured bacterium m1e1-41	AF280862	91	LaPara T.M. et al., 2000
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	AV5-33	AM181905	218	uncultured bacterium clone 188up	AY212640	99	Simpson,J.M. et al., 2004
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	AV5-68	AM181935	218	Ideonella sp. B508-1	AB049105	99	Elbeltagy,A. et al., 2001
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	AV5-36	AM181908	320	uncultured bacterium clone GZKB25	AJ853520	97	Huang,L.N. et al, 2005
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophilaes</i>	AV5-64	AM181931	70	uncultured bacterium clone 191up	AY212644	99	Simpson,J.M. et al., 2004
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophilaes</i>	AV5-9	AM181888	220	uncultured bacterium m1e1-7	AF280846	91	
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophilaes</i>	AV5-17	AM181893	220	uncultured beta proteobacterium clone ccs265	AY133064	99	Carroll,A.B., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Methylphilales</i>	AV5-83	AM181946	222	uncultured bacterium clone mv13.3	AY424824	95	Hutchens,E. et al., 2004
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-28	AM181901	220	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	98	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-85	AM181948	222	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	98	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-10	AM181889	224	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	97	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-13	AM181892	224	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	96	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-27	AM181900	224	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	98	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-84	AM181947	224	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	98	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	AV5-1	AM181883	224	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	98	Alfreider,A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-2	AM181884	218	<i>Dechloromonas agitata</i> strain MA-1	AY277621	99	Wolterink,A., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-43	AM181914	218	<i>Azonexus</i> sp. Slu-05	AB166882	99	Im,W.T. und Lee,S.T., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-59	AM181927	218	<i>Azonexus</i> sp. Slu-05	AB166882	99	Im,W.T. und Lee,S.T., unveröffentlicht

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-72	AM181938	218	<i>Azonexus</i> sp. Slu-05	AB166882	99	Im, W.T. und Lee, S.T., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-79	AM181942	218	<i>Dechloromonas agitata</i> strain MA-1	AY277621	99	Wolterink, A., 2003 unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-81	AM181944	218	uncultured bacterium clone: TSAU03	AB186833	97	Yoshida, N., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-92	AM181953	218	<i>Dechloromonas</i> sp. MissR	AF170357	99	Achenbach L.A., 1999
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	AV5-93	AM181954	220	<i>Dechloromonas</i> sp. JJ	AY032611	98	Coates, J.D. et al., 2001
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV5-90	AM181951	70	uncultured gamma proteobacterium clone 426T3	DQ110125	94	Weber, K.A. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV5-56	AM181924	70	<i>Methylocaldum</i> sp. Dr65	AF215632	89	Fischer, C.M., 1999 unpublished
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	AV5-11	AM181890	252	<i>Methylomonas</i> sp. KSPIII		98	Hanada, S. et al 1998
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV5-23	AM181896	274	<i>Desulfobacter postgatei</i> DSM 2034	AF418180	99	Friedrich, M.W., 2002
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV5-38	AM181910	207	<i>Trichlorobacter thiogenes</i> (T)	AF223382	98	De Wever H. et al., 2000
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV5-67	AM181934	210	uncultured delta proteobacterium clone 4aFS	AM039962	94	Perner, M., Thesis. 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV5-69	AM181936	210	uncultured delta proteobacterium clone 4aFS	AM039962	94	Perner, M., Thesis. 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV5-80	AM181943	276	<i>Desulfonema ishimotonii</i>	U45991	87	
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	AV5-95	AM181955	210	uncultured delta proteobacterium clone 4aFS	AM039962	94	Perner, M., Thesis. 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Myxococcales</i>	AV5-52	AM181921	77	uncultured delta proteobacterium clone HMMVPog-4	AJ704687	89	Loesekann, T. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	AV5-86	AM181949	249	uncultured bacterium clone ga19	DQ093891	92	Zu, Y., 2005 unveröffentlicht
Chloroplast	AV5-44	—	877	Chloroplast			
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	AV5-74	AM181940	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* mittels „megaBlast Search“;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

^c Unspezifische Amplifikation archaeeller 16S rRNA mittels *Bacteria*-spezifischem PCR-Assay (s. III.3.2.3)

Tabelle 35: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rcDNA-Klone, erzeugt aus mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten RNA-Extrakten („schwere“ Fraktion C3 nach 18 Tagen Inkubation) und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*. ^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Chloroflexi</i>	C3-19	AM181969	221	uncultured bacterium isolate JH10_C09	AY568768	93	Cho, H.Y. et al., unveröffentlicht
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	C3-24	AM181972	303	<i>Termitobacter aceticus</i> (T)	Z49863	95	Grech-Mora, I. et al., 1996
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Burkholderiales</i>	C3-42	AM181985	199	<i>Delftia acidovorans</i>	AB074256	99	Sota, M., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	C3-60	AM181991	224	uncultured bacterium clone GOUTA12	AY050584	97	Alfreider, A. et al., 2002
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	C3-17	AM181967	70	<i>Methylomonas rubra</i>	AF150807	99	Costello, A.M. et al, 1999
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-1	AM181957	231	uncultured bacterium clone: TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-104	AM182013	231	uncultured bacterium clone: TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-13	AM181964	231	uncultured bacterium clone: TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-14	AM181965	231	uncultured bacterium clone: TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-15	AM181966	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-18	AM181968	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-20	AM181970	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-29	AM181975	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-3	AM181958	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-30	AM181976	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-31	AM181977	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-33	AM181979	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-36	AM181980	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-38	AM181981	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-41	AM181984	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-44	AM181986	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-55	AM181988	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-59	AM181990	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-63	AM181993	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-64	AM181994	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-67	AM181995	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-68	AM181996	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-7	AM181960	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-75	AM181998	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-76	AM181999	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-77	AM181200	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-78	AM1812001	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-8	AM181961	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-81	AM1812002	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-82	AM1812003	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-92	AM1812007	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-97	AM1812010	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Nitrospira</i> nicht klassifiziert	C3-99	AM1812011	231	uncultured bacterium clone:TSBW20	AB186881	90	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Verrucomicrobium</i> nicht klassifiziert	C3-25	AM181973	224	Bacterium Ellin5102	AY234519	93	Joseph, S.J. et al., 2003
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	C3-102	AM182012	204	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	92	Lueders,T. et al., 2004
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	C3-11	AM181962	204	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	92	Lueders,T. et al., 2004
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	C3-12	AM181963	204	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	92	Lueders,T. et al., 2004
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	C3-26	AM181974	204	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	92	Lueders,T. et al., 2004
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	C3-32	AM181978	204	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	92	Lueders,T. et al., 2004
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-22	AM181971	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-39	AM181982	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-40	AM181983	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-5	AM181959	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	98	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-54	AM181987	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	98	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-58	AM181989	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-62	AM181992	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-69-t	AM181997	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-88	AM1812005	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-89	AM1812006	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-93	AM1812008	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	99	Williams, D. et al, unveröffentlicht
<i>Euryarchaeota</i> ^c <i>Methanosarcinales</i>	C3-96	AM1812009	214	uncultured archaeon 61-2	AF424767	98	Williams, D. et al, unveröffentlicht

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* mittels „megaBlast Search“;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

^c Unspezifische Amplifikation archaeeller 16S rRNA mittels *Bacteria*-spezifischem PCR-Assay (s. III.3.2.3)

A.4 Sequenzdaten zu III.4.2

Tabelle 36: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rcDNA-Klone, erzeugt aus revers-transkribierten RNA-Extrakten von Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediment des See Geneareth nach Zugabe von *Peridinium gatunense*-Zellen zum Zeitpunkt Null und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*. ^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Acidobacteria</i> (<i>Holophaga</i>)	d0-24	—	255	uncultured <i>Acidobacteria</i> , clone SS_LKC29_UB26	AM180885	95	Zimmermann, J. et al., unveröffentlicht
<i>Actinobacteria</i> („ <i>Microthrix</i> “)	d0-47	—	237	uncultured <i>Actinobacteria</i> clone AKYH901	AY921917	94	Tringe, S.G. et al., 2005
<i>Actinobacteria</i> („ <i>Microthrix</i> “)	d0-74	—	237	uncultured <i>Actinobacteria</i> clone AKYH901	AY921917	94	Tringe, S.G. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d0-64	—	40	uncultured <i>Bacteroidetes</i> clone 033T7	DQ110029	94	Weber, K.A. et al., 2006
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d0-102	—	40	uncultured <i>Bacteroidetes</i> , clone HrhB26	AM159243	87	Lu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d0-30	—	173	uncultured bacterium clone BA017	AF323759	93	Wu, J.H. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d0-50	—	410	uncultured bacterium clone ga21	DQ093892	92	Zu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-4	—	68	uncultured bacterium, clone: RB390	AB240366	95	Nakamura, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-10	—	218	uncultured bacterium clone cs48	DQ088265	92	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-25	—	223	uncultured <i>Chloroflexi</i> clone LAS-B16N	AF513960	89	Donachie, S.P. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-9	—	225	uncultured <i>Chloroflexi</i> clone AKYG1612	AY921915	91	Tringe, S.G. et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-78	—	228	uncultured bacterium, clone SHA-20	AJ306742	97	Schloetelburg, C., unpublischd
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-29	—	253	uncultured bacterium clone cs48	DQ088265	93	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d0-21	—	263	uncultured bacterium, clone: RB520	AB240223	91	Nakamura, Y., et al., unveröffentlicht
<i>Cyanobacteria</i> <i>Chroococcales</i>	d0-70	—	139	<i>Synechococcus</i> sp. 0BB22S0, strain 0BB22S05	AJ639898	98	Castiglioni, B. et al., 2005

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
Cyanobacteria Chroococcales	d0-18	—	183	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BF29S01	AJ635431	99	Castiglioni, B. et al., 2005
Cyanobacteria Chroococcales	d0-22	—	183	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BF29S01	AJ635431	99	Castiglioni, B. et al., 2005
Cyanobacteria Nostocales	d0-71	—	295	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AF067818	99	Saker, M.L. et al., 1998
Deferribacteres nicht klassifiziert	d0-45	—	81	unidentified bacterium wb1_H02	AF317766	85	Holmes, A.J. et al., 2001
Deferribacteres nicht klassifiziert	d0-11	—	294	uncultured bacterium	AB177256	89	Holmes, A.J. et al., 2001
Deferribacteres nicht klassifiziert	d0-31	—	302	unidentified bacterium wb1_H02	AF317766	86	Holmes, A.J. et al., 2001
Deferribacteres nicht klassifiziert	d0-32	—	302	unidentified bacterium wb1_H02	AF317766	86	Holmes, A.J. et al., 2001
Fibrobacteres nicht klassifiziert	d0-8	—	255	<i>Fibrobacter intestinalis</i> (strain JG1)	M62690	87	Amann, R.I. et al., unveröffentlicht
Fusobacteria nicht klassifiziert	d0-54	—	154	uncultured bacterium clone pLW-99	DQ067040	91	Nercessian, O. et al., 2005
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-87	—	70	uncultured bacterium mle1-41	AF280862	96	LaPara, T.M. et al., 2000
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-65	—	81	uncultured <i>Planctomycetales</i> , clone: HAUD-MB/2-35	AB176696	84	Hirayama, H. et al., 2005
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-89	—	81	uncultured <i>Planctomycetales</i> , clone: HAUD-MB/2-35	AB176696	84	Hirayama, H. et al., 2005
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-43	—	146	uncultured bacterium clone ga47	DQ093915	84	Zu, Y. et al., unveröffentlicht
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-36	—	147	uncultured bacterium clone ga47	DQ093915	84	Zu, Y. et al., unveröffentlicht
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-90	—	207	<i>Pirellula</i> sp. (strain AGA/M41)	X86390	88	Fuerst, J.A. et al., 1997
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-56	—	215	uncultured bacterium clone MB-C2-147	AY093482	83	Reed, D.W. et al., 2002
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-58	—	227	unidentified bacterium, clone: BD2-16	AB015544	84	Li, L. et al., 1999
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-86	—	236	uncultured planctomycete, clone DEL75	AJ616291	93	Brummer, I.H. et al., 2004
Planctomycetes nicht klassifiziert	d0-97	—	276	uncultured planctomycete clone: K156 (nur hinterer Teil)	AB116401	89	Asami, H. et al., 2005
Spirochaetes nicht klassifiziert	d0-16	—	244	uncultured bacterium clone: LCFA-B06	AB244313	89	Shigematsu, T. et al.,
Verrucomicrobia Spartobacteria	d0-99	—	181	unidentified eubacterium LD29	AF009975	98	Zwart, G. et al., 1998
Verrucomicrobia nicht klassifiziert	d0-60	—	142	misnomer: [<i>Cytophaga</i>] sp. Dex80-64	AJ431235	88	Cambon-Bonavita, M.A. et al.,
Verrucomicrobia nicht klassifiziert	d0-26	—	204	uncultured bacterium clone ZB140	AY327234	90	Elshahed, M.S. et al., 2003
Betaproteobacteria Burkholderiales	d0-44	—	218	uncultured bacterium clone 192up	AY212645	96	Simpson, J.M. et al., 2004
Betaproteobacteria Hydrogenophilales	d0-95	—	70	uncultured bacterium clone 191up	AY212644	98	Simpson, J.M. et al., 2004
Betaproteobacteria Nitrosomonadales	d0-49	—	222	uncultured bacterium, clone: Run-S67	AB247475	97	Lee, M. et al., unveröffentlicht
Gammaproteobacteria Alteromonadales	d0-46	—	40	uncultured gamma proteobacterium clone PL_4f6d	AY580735	90	Acinas, S.G. et al., 2004
Gammaproteobacteria Chromatiales	d0-92	—	77	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	92	Bothorel, V. et al., unveröffentlicht
Gammaproteobacteria Chromatiales	d0-6	—	187	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	95	Bothorel, V. et al., unveröffentlicht
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-3	—	70	<i>Methylobacter</i> sp. BB5.1	AF016981	95	Smith, K.S. et al., 1997
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-17	—	70	<i>Methylocaldum</i> sp. dr65	AF215632	91	Fischer, C.M. et al., unveröffentlicht
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-28	—	70	uncultured gamma proteobacterium clone: HAUD-LB16	AB113617		Hirayama, H. et al., 2005
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-40	—	70	<i>Methylobacter</i> sp. T20	AF131868	97	Ren, T. et al., 2000
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-55	—	70	<i>Methylobacter</i> sp. SV96	AJ414655	97	Wartiainen, I. et al., 2006
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-59	—	70	uncultured bacterium clone pLW-20	DQ066946	94	Nercessian, O. et al., 2005
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-98	—	70	uncultured gamma proteobacterium clone: HAUD-LB16	AB113617	95	Hirayama, H. et al., 2005
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-41	—	78	uncultured gamma proteobacterium clone: HAUD-LB16	AB113617	93	Hirayama, H. et al., 2005
Gammaproteobacteria Methylococcales	d0-14	—	252	uncultured bacterium clone pLW-17	DQ066943	95	Nercessian, O. et al., 2005

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d0-82	—	252	<i>Methylomonas</i> sp. LW13	AF150792	95	Costello,A.M. und Lidstrom,M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	d0-15	—	198	uncultured gold mine bacterium D52	AF337875	97	Nemergut,D.R. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-7	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-27	—	210	uncultured bacterium clone KM62	AY216453	94	Milbrandt,E.C., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-53	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-63	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-66	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-61	AJ535249	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-79	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-94	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	89	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-23	—	212	<i>Olavius algarvensis</i> sulfate-reducing endosymbiont	AJ704678	92	Loesekann,T. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterales</i>	d0-33	—	79	<i>Desulfonema limicola</i>	U45990	96	Fukui,M. et al., 1999
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-69	—	242	<i>Desulfobacterium anilini</i> , strain DSM 4660	AJ237601	92	Hippe,H. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-2	—	274	<i>Desulfonema ishimotoei</i>	U45991	87	Fukui,M. et al., 1999
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d0-13	—	940	uncultured bacterium, clone 166	AJ831748	96	Tonolla,M.A. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfuromonadales</i>	d0-5	—	210	uncultured <i>Desulfuromonadales</i>	AY177804	91	Purdy,K.J. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfuromonadales</i>	d0-20	—	217	uncultured <i>Geobacter</i> sp. clone X3Ba20	AY607119	97	Lueders,T. et al.,2004
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Myxococcales</i>	d0-61	—	68	uncultured bacterium clone ZB8	AY327184	90	Elshahed,M.S. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Myxococcales</i>	d0-91	—	194	uncultured bacterium clone ZB8	AY327184	90	Elshahed,M.S. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Myxococcales</i>	d0-1	—	224	uncultured bacterium uASB_TL25	AF254393	94	Wu,J.H. et al., 2001
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-83	—	78	uncultured bacterium clone pLW-41	DQ067032	97	Nercessian,O. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-19	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-52	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-57	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-81	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-85	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-51	—	206	<i>Syntrophus</i> sp., Clone B3	DQ093881	97	Zu,Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d0-84	—	206	uncultured bacterium, clone 172	AJ831750	92	Tonolla,M.A. et al., 2005
Candidatus Division OP3	d0-62	—	245	uncultured bacterium clone CrystalBog021B9	AY792312	83	Newton,R.J. et al., unveröffentlicht
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	d0-96	—	266	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	88	Lueders,T. et al.,2004
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	d0-42	—	286	uncultured <i>Holophaga</i> sp. clone X3Ba60	AY607148	91	Lueders,T. et al.,2004
unbekannte Zugehörigkeit (neues Cluster)	d0-39	—	69	uncultured bacterium clone GN01-8.076	DQ154831	86	Dillon,J.G. et al., unveröffentlicht
Chloroplast	d0-34t	—	314	Uncultured algae chloroplast, clone Sta2-37	AJ427435		Zwart,G.J.M. et al., 2002
Chloroplast	d0-12	—	876	<i>Melosira varians</i> chloroplast, strain p107	AJ536464		Medlin,L.K. und Kaczmarska,I. unveröffentlicht
Chloroplast	d0-37	—	876	<i>Melosira varians</i> chloroplast, strain p107	AJ536464		Medlin,L.K. und Kaczmarska,I. unveröffentlicht
Chloroplast	d0-77	—	876	<i>Melosira varians</i> chloroplast, strain p107	AJ536464		Medlin,L.K. und Kaczmarska,I. unveröffentlicht
Chloroplast	d0-80	—	876	<i>Melosira varians</i> chloroplast, strain p107	AJ536464		Medlin,L.K. und Kaczmarska,I. unveröffentlicht

Anhang A

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels „megaBlast Search“;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

Tabelle 37: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rDNA-Klone, erzeugt aus revers-transkribierten RNA-Extrakten von Sedimentaufschlammungen des Profundalsediment des See Genezareth nach Zugabe von *Peridinium gatunense*-Zellen nach eintägiger Inkubation bei 15°C und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*. ^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	<i>HaeIII</i>	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Acidobacteria</i> nicht klassifiziert	d1-62	—	204	uncultured bacterium clone pLW-61	DQ067000	93	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Actinobacteria</i> (<i>Microthrix</i>)	d1-59	—	92	uncultured <i>Actinobacteria</i> clone AKYG619	AY921831	93	Tringe, S.G. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-75	—	40	uncultured bacterium clone 118ds10	AY212569	95	Simpson, J.M. et al., 2004
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-2	—	40	uncultured anaerobic bacterium clone C-85	DQ018797	96	Von Arb, M.A. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-86	—	40	uncultured anaerobic bacterium clone C-85	DQ018797	96	Von Arb, M.A. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-88	—	40	uncultured <i>Bacteroidetes</i> , clone HrhB26	AM159243	89	Lu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-82	—	40	uncultured bacterium, clone: BS049	AB240238	97	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-26	—	370	uncultured <i>Bacteroidetes</i> , clone HrhB26	AM159243	87	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-76	—	370	uncultured <i>Bacteroidetes</i> , clone HrhB26	AM159243	87	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d1-28	—	410	uncultured bacterium, clone: BS049	AB240238	94	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-34	—	68	uncultured bacterium, clone: RB390	AB240366	88	Nakamura, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-53	—	68	uncultured bacterium, clone: RB390	AB240366	89	Nakamura, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-51t	—	185	uncultured bacterium SHA-300	AJ249112	92	Schlotterburg, C. et al., 2000
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-39	—	198	uncultured bacterium clone FS117-41B-02	AY869683	91	Huber, J.A. et al., 2006
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-96	—	215	uncultured <i>Chloroflexi</i> clone AKYH412	AY921851	92	Tringe, S.G. et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-1	—	219	uncultured bacterium clone cs48	DQ088265	95	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-3	—	219	uncultured bacterium clone cs48	DQ088265	95	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-22	—	219	uncultured bacterium clone GN01-8.065	DQ154828	89	Dillon, J.G. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-70	—	221	uncultured bacterium clone 24	DQ165109	93	Gibney, B.P. und Nusslein, K.R., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-23	—	222	uncultured bacterium clone cs48	DQ088265	90	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-78	—	222	uncultured bacterium, clone: RB520	AB240223	92	Nakamura, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-68	—	223	uncultured bacterium clone GN01-8.065	DQ154828	89	Dillon, J.G. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-65	—	256	uncultured bacterium, clone: SRRB40	AB240513	97	Nakamura, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d1-43	—	279	uncultured bacterium, clone: SRRB40	AB240513	92	Nakamura, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Cyanobacteria</i> <i>Chroococcales</i>	d1-6	—	183	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BB35S02	AJ635430	99	Castiglioni, B. et al., 2005
<i>Cyanobacteria</i> <i>Chroococcales</i>	d1-13	—	183	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BB35S02	AJ635430	99	Castiglioni, B. et al., 2005
<i>Deferribacteres</i> nicht klassifiziert	d1-17	—	268	uncultured bacterium isolate JH12_C23	AY568864	90	Cho, H.Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deferribacteres</i> nicht klassifiziert	d1-79	—	302	unidentified bacterium wb1_H02	AF317766	85	Holmes, A.J. et al., 2001

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Fibrobacteres</i> nicht klassifiziert	d1-57	—	324	uncultured bacterium clone oc31	AY491574	88?	Phung,N.T. et al., 2004
<i>Fusobacteria</i> nicht klassifiziert	d1-50	—	280	uncultured <i>Fusobacteria</i> clone 467T3	DQ110113	98	Weber,K.A. et al., 2006
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	d1-92	—	221	uncultured <i>Clostridia</i> clone X9Ba88	AY607218	94	Lueders,T. et al., 2004
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	d1-4	—	255	uncultured soil bacterium clone 397	AY493973	97	Kim,J.-S. und Crowley,D.E., unveröffentlicht
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	d1-52	—	297	uncultured <i>Clostridiaceae</i> , clone LrhB59	AM159365	99	Lu,Y., et al., unveröffentlicht
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	d1-85	—	297	uncultured <i>Clostridiaceae</i> , clone LrhB59	AM159365	99	Lu,Y., et al., unveröffentlicht
<i>Firmicutes</i> <i>Clostridiales</i>	d1-19	—	299	uncultured <i>Clostridiales</i> clone M10Ba34	AY360624	99	Lueders et al., 2004
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d1-94	—	172	uncultured planctomycete clone C8	AY360083	93	Tal,Y. et al., unveröffentlicht
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d1-36	—	219	unidentified eubacterium clone vadinBA30	U81656	94	Godon,J.J. et al., 1997
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d1-74	—	219	unidentified eubacterium clone vadinBA30	U81656	94	Godon,J.J. et al., 1997
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d1-49	—	268	uncultured bacterium clone HTC12	AF418950	97	Stein,L.Y. et al., 2002
<i>Spirochaetes</i> nicht klassifiziert	d1-45	—	196	uncultured bacterium, clone: M1PT4-39	AB191981	85	Hongoh,Y. et al., 2005
<i>Verrucomicrobia</i> Subdivision IV	d1-18	—	223	uncultured bacterium clone AKAU3960	DQ125814	95	Brodie,E.L. et al., unveröffentlicht
<i>Verrucomicrobia</i> Subdivision IV	d1-32	—	223	uncultured bacterium clone AKAU3960	DQ125814	95	Brodie,E.L. et al., unveröffentlicht
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d1-67	—	68	missname [<i>Cytophaga</i>] sp. Dex80-64	AJ431235	85	Cambon-Bonavita,M.A. et al., unveröffentlicht
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d1-47	—	179	Bacterium Ellin5102	AY234519	96	Joseph,S.J. et al., 2003
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d1-35	—	190	uncultured bacterium, clone:LS4-117	AB234284	93	Hiraishi,A. et al., 2005
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d1-46	—	223	uncultured bacterium clone PK286	AY555797	92	Kanokratana,P. et al., 2004
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d1-69	—	233	uncultured bacterium clone S-BQ2_57	DQ017935	91	Beier,S. et al., unveröffentlicht
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d1-72	—	258	uncultured bacterium clone pLW-89	DQ067008	87	Nercessian,O. et al., 2005
<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i>	d1-8	—	40	uncultured bacterium, clone:LS4-132	AB234239	97	Hiraishi,A. et al., 2005
<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i>	d1-11	—	196	uncultured alpha proteobacterium clone AKYG1560	AY921960	98	Tringe,S.G. et al., 2005
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Hydrogenophila</i>	d1-83	—	220	uncultured bacterium clone 5-25R	AY955086	94	Qu,J.H. und Yuan,H.L., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	d1-61	—	220	<i>Dechloromonas</i> sp. JJ	AY032611	98	Coates,J.D. et al., 2001
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d1-37	—	70	uncultured gamma proteobacterium, clone: HAUd-LB16	AB113617	93	Hirayama,H. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d1-40	—	70	<i>Methylocaldum</i> sp. dr65	AF215632	89	Fischer,C.M. et al, unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d1-48	—	70	<i>Methylobacter</i> sp. LW12	AY007295	97	Auman,A.J. et al., 2000
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d1-56	—	70	<i>Methylocaldum</i> sp. dr65	AF215632	89	Fischer,C.M. et al, unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d1-24	—	244	uncultured bacterium clone pLW-21	DQ066947	98	Nercessian,O. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d1-63	—	252	<i>Methylomonas</i> sp. LW13	AF150792	95	Costello,A.M. und Lidstrom,M.E., 1999
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d1-38	—	191	uncultured delta proteobacterium clone GoM IDB-15	AY542227	94	Mills,H.J. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d1-64	—	194	uncultured bacterium, clone: RB380	AB240361	96	Nakamura,Y. et al, unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d1-71	—	204	uncultured bacterium, clone: RB356	AB240351	98	Nakamura,Y. et al, unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d1-77	—	211	<i>Desulfococcus biacutus</i> , strain DSM 5651T	AJ277887	89	Hippe,H. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d1-14	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	89	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d1-42	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-44	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-73	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone 4aFS	AM039962	94	Perner,M., 2003 (Thesis)
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-80	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-21	—	242	<i>Desulfobacterium anilini</i> , strain DSM 4660	AJ237601	92	Hippe,H. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-60	—	242	uncultured bacterium isolate JH12_C61	AY568900	93	Cho,H.Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-41	—	276	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	AY493562	91	Cravo-Laureau,C., et al. 2004
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-95	—	278	<i>Desulfococcus multivorans</i> DSM 2059	AF418173	91	Friedrich,M.W., 2002
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-33	—	278	uncultured bacterium clone cws275	AY799892	97	O'Neill,A.H. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-81	—	427	<i>Desulfococcus biacutus</i> , strain DSM 5651T	AJ277887	90	Hippe,H. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Desulfobacterlaes</i>	d1-87	—	940	uncultured bacterium, clone 166	AJ831748	96	Tonolla,M.A. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria Desulfuromonadales</i>	d1-54	—	217	uncultured <i>Geobacter</i> sp. clone X3Ba20	AY607119	96	Lueders,T. et al., 2004
<i>Deltaproteobacteria Myxococcales</i>	d1-29	—	204	uncultured bacterium clone BE16FW031601GDW_hole1-3	DQ088736	93	Lin,L.-H. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Myxococcales</i>	d1-31	—	206	uncultured proteobacterium clone SIMO-1721	AY711087	89	Moran,M.A. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Myxococcales</i>	d1-5	—	236	uncultured bacterium isolate JH12_C94	AY568929	92	Cho,H.Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Syntrophobacterales</i>	d1-58	—	78	uncultured bacterium, clone:BLB03	AB248625	96	Tang,Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Syntrophobacterales</i>	d1-10	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Syntrophobacterales</i>	d1-15	—	204	uncultured bacterium	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria Syntrophobacterales</i>	d1-90	—	240	uncultured <i>Syntrophobacter</i> sp. clone X3Ba04	AY607108	92	Lueders,T. et al., 2004
<i>Epsilonproteobacteria Campylobacterales</i>	d1-30	—	545	uncultured <i>Helicobacteraceae</i>	AJ810529	95	Brettar,I. et al., 2006
Candidatus Phylum „Endomicrobia“	d1-27	—	216	uncultured Termite group 1 bacterium clone S-J147	AY622271	88	Reardon,C.L. et al., 2004
Chloroplast	d1-66	—	876		AJ536464	96	

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels „megaBlast Search“;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

Tabelle 38: Phylogenetische Verwandtschaft und Sequenzidentität bakterieller 16S rcDNA-Klone, erzeugt aus revers-transkribierten RNA-Extrakten von Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediment des See Genezareth nach Zugabe von *Peridinium gatunense*-Zellen nach sechstägiger Inkubation bei 15°C und deren Zuordnung zu T-RFs nach *in silico* Restriktion mit *HaeIII*. ^a

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Actinobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-30	—	212	unidentified bacterium clone W4-B35	AY345497	94	Donachie,S.P. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes Flavobacterales</i>	d6-29	—	613	<i>Flavobacterium</i> sp. WB 2.1-80	AM167560	97	Brambilla,E., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-27	—	40	uncultured <i>Bacteroidetes</i> clone 033T7	DQ110029	96	Weber,K.A. et al., 2006
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-47	—	40	uncultured bacterium, clone: BS049	AB240238	97	Nakamura,Y., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-7	—	40	<i>Cytophaga fermentans</i>	M58766	89	Ghera und Woese, 1992
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-78	—	40	<i>Cytophaga fermentans</i>	M58766	88	Ghera und Woese, 1992

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-31	—	40	<i>Alkaliflexus imshenetskii</i> , type strain Z-7010	AJ784993	88	Zhilina, T.N. et al., 2004
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-32	—	118	uncultured bacterium clone EV818CFSSAHH27	DQ336982	84	Gihring, T. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-66	—	215	uncultured bacterium clone EV818CFSSAHH27	DQ336982	84	Gihring, T. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-18	—	215	uncultured bacterium, clone:LS4-147	AB234243	89	Hiraishi, A. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-15	—	251	uncultured <i>Bacteroidetes</i> clone LiUU-11-74	AY509350	91	Eiler, A. und Bertilsson, S., 2004
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-3	—	253	uncultured bacterium clone KD3-123	AY188302	94	Zhang, R. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-4	—	412	uncultured bacterium clone pLW-54	DQ066990	95	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-13	—	412	uncultured bacterium clone pLW-54	DQ066990	95	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-20t	—	910	uncultured bacterium clone ga02	DQ093877	94	Zu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-62	—	910	uncultured bacterium clone ga02	DQ093877	94	Zu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Bacteroidetes</i> nicht klassifiziert	d6-90	—	911	uncultured <i>Bacteroidetes</i> , clone HrhB26	AM159243	90	Lu, Y. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-35	—	64	uncultured bacterium a1b002	AF419668	84	Teske, A. et al., 2002
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-57	—	75	uncultured bacterium gene for 16S rRNA	AB177241	87	Inagaki, F. et al., 2006
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-85	—	221	uncultured bacterium clone GN01-0.052	DQ154842	90	Dillon, J.G. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-70	—	222	uncultured bacterium clone cs48	DQ088265	90	Ren, N.-Q. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-44	—	223	uncultured bacterium clone GN01-8.065	DQ154828	89	Dillon, J.G. et al., unveröffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-65	—	230	uncultured bacterium, clone: BS063	AB240244	95	Nakamura, Y., unverö ffentlicht
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-38	—	259	uncultured bacterium SHD-43	AJ278172	92	Schloetelburg, C. et al., 2002
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-34	—	263	uncultured bacterium clone pLW-96	DQ067035	95	Nercessian, O. et al., 2005
<i>Chloroflexi</i> nicht klassifiziert	d6-9	—	265	uncultured bacterium, clone: SRRT29	AB240474	92	Nakamura, Y., unverö ffentlicht
<i>Cyanobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-54	—	318	uncultured rumen bacterium 4C0d-2	AB034016	95	Tajima, K. et al., 2000
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d6-71	—	172	uncultured bacterium isolate JH10_C28	AY568785	91	Cho, H.Y. et al., unveröffentlicht
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d6-8	—	238	uncultured planctomycetales bacterium, clone S15A-MN16	AJ534691	86	Nedelkova, M., unveröffentlicht
<i>Planctomycetes</i> nicht klassifiziert	d6-81	—	252	uncultured bacterium, clone SHA-43	AJ306766	95	Schloetelburg, C., unveröffentlicht
<i>Spirochaetes</i> <i>Spirochaetales</i>	d6-55	—	183	<i>Spirochaeta</i> sp. MWH-HuW24	AJ565434	97	Hahn, M.W. et al., 2004
<i>Spirochaetes</i> <i>Spirochaetales</i>	d6-48	—	208	uncultured bacterium	AB177322	87	Inagaki, F. et al., 2006
<i>Spirochaetes</i> <i>Spirochaetales</i>	d6-84	—	208	uncultured spirochete clone LH042	AY605171	88	Guerrero, R. et al., unveröffentlicht
<i>Spirochaetes</i> nicht klassifiziert	d6-87	—	220	uncultured bacterium clone B9	AF455063	94	Pereira, M.A. et al., 2002
<i>Verrucomicrobia</i> Subdivision IV	d6-63	—	223	uncultured bacterium, clone: MIZ01	AB179492	89	Yoshida, H. et al., unveröffentlicht
<i>Verrucomicrobia</i> nicht klassifiziert	d6-83	—	422	unidentified bacterium	AB015533	85	Li, L. et al., 1999
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Nitrosomonadales</i>	d6-73	—	222	uncultured bacterium, clone: TSAQ22	AB186828	97	Yoshida, N. et al., 2005
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	d6-76	—	199	Bacterium 6RO2	AY928246	???	Haveman, S.A. et al., unveröffentlicht
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	d6-11	—	222	<i>Propionivibrio limicola</i> , strain GolChi1 T	AJ307983	96	Brune, A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	d6-36	—	222	<i>Propionivibrio limicola</i> , strain GolChi1 T	AJ307983	96	Brune, A. et al., 2002
<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclales</i>	d6-80	—	222	<i>Propionivibrio limicola</i> , strain GolChi1 T	AJ307983	96	Brune, A. et al., 2002
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Chromatiales</i>	d6-74	—	187	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	94	Bothorel, V. et al., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Chromatiales</i>	d6-75	—	187	<i>Halochromatium</i> sp. AR2202	AJ401219	94	Bothorel, V. et al., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-28	—	70	uncultured <i>Methylobacter</i> pAMC419	AF150775	97	Costello, A.M. und Lidstrom, M.E., 1999

Anhang A

Phylogenetische Gruppe	Klon-Bezeichnung	„Accession number“ ^a	HaeIII	nächster Verwandter	„Accession number“	Sequenz-Identität (%)	Referenz ^b
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-82	—	70	<i>Methylobacter</i> sp. BB5.1	AF016981	95	Smith,K.S. et al., 1997
<i>Gammaproteobacteri</i> <i>Methylococcales</i>	d6-88	—	70	<i>Methylobacter</i> sp. LW1	AF150784	96	Costello,A.M. und Lidstrom,M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteri</i> <i>Methylococcales</i>	d6-5	—	70	uncultured gamma proteobacterium	AB113617	93	Hirayama,H. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-58	—	70	uncultured gamma proteobacterium	AB113617	94	Hirayama,H. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-72	—	70	<i>Methylocaldum</i> sp. dr65	AF215632	90	Fischer,C.M. et al., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-16	—	70	uncultured , clone D14307	AJ617834	94	Noll,M. et al., 2005
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-37	—	70	<i>Methylomonas</i> sp. LW21	AF150800	98	Costello,A.M. und Lidstrom,M.E., 1999
<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Methylococcales</i>	d6-52	—	252	uncultured gamma proteobacterium clone g1	DQ367735	95	Kalyuzhnaya,M.G. et al., unveröffentlicht
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-42	—	40	uncultured bacterium clone 125ds10	AY212576	98	Simpson,J.M. et al., 2004
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-46	—	40	uncultured bacterium clone 125ds10	AY212576	98	Simpson,J.M. et al., 2004
<i>Gammaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-40	—	199	uncultured gamma proteobacterium clone LKCS_156.55	AY510239	95	Engel,A.S. et al., 2004
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Bdellovibrionales</i>	d6-22	—	237	uncultured delta proteobacterium, clone HMMVBeg-13	AJ704676	87	Loesekann,T. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Bdellovibrionales</i>	d6-89	—	237	uncultured delta proteobacterium, clone HMMVBeg-13	AJ704676	87	Loesekann,T. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-56t	—	42	uncultured <i>Desulfomonile</i> sp., clone 651	AJ316024	99	Tonolla,M.A. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-67	—	191	uncultured bacterium, clone 166	AJ831748	97	Tonolla,M.A. et al., 2005
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-69	—	206	uncultured bacterium clone PK331	AY555806	94	Kanokratana,P. et al., 2004
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-50	—	242	uncultured delta proteobacterium clone 454T3	DQ110103	97	Weber,K.A. et al., 2006
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-24	—	258	uncultured bacterium, clone: RB380	AB240361	97	Nakamura,Y.,unverö fffentlich
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-17	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-86	—	210	uncultured delta proteobacterium, clone Hyd89-63	AJ535248	94	Knittel,K. et al., 2003
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfobacterlaes</i>	d6-61	—	212	uncultured delta proteobacterium clone KorMud-V1C71	DQ112376	94	Cho,H.-Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfuromonadales</i>	d6-59	—	207	uncultured bacterium, clone: HSM-SS-018	AB238781	97	Akiyama,M. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d6-14	—	204	uncultured bacterium gene for 16S rRNA	AB195926	92	Kim,G. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Syntrophobacterales</i>	d6-79	—	205	uncultured bacterium, clone:BLB03	AB248625	94	Tang,Y. et al., unveröffentlicht
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-2	—	245	uncultured delta proteobacterium SHD-127	AJ278162	93	Schloetelburg,C. et al., 2002
<i>Deltaproteobacteria</i> nicht klassifiziert	d6-25	—	245	uncultured delta proteobacterium SHD-127	AJ278162	93	Schloetelburg,C. et al., 2002
Candidatus Division OP3	d6-26	—	88	unclassified bacterial species, isolate koll11	AJ224540	82	Pace,N. et al., unveröffentlicht
Candidatus Division OP3	d6-23	—	253	uncultured bacterium	AB232806	87	Shigematsu,T. et al., unveröffentlicht
unbekannte Zugehörigkeit (neues Cluster)	d6-33	—	339	uncultured bacterium, clone c5LKS14	AM086111	85	Schwarz,J.I.K. et al., unveröffentlicht
Chloroplast	d6-41	—	876				

^a Phylogenetische Einordnung innerhalb der *Bacteria* mittels „megaBlast Search“;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/megablast.shtml>.

^b Referenzen können über Datenbankeinträge der nächsten Verwandten bezogen werden.

Anhang B

B.1 T-RFLP-Profil (Elektropherogramme) zu III.1.2

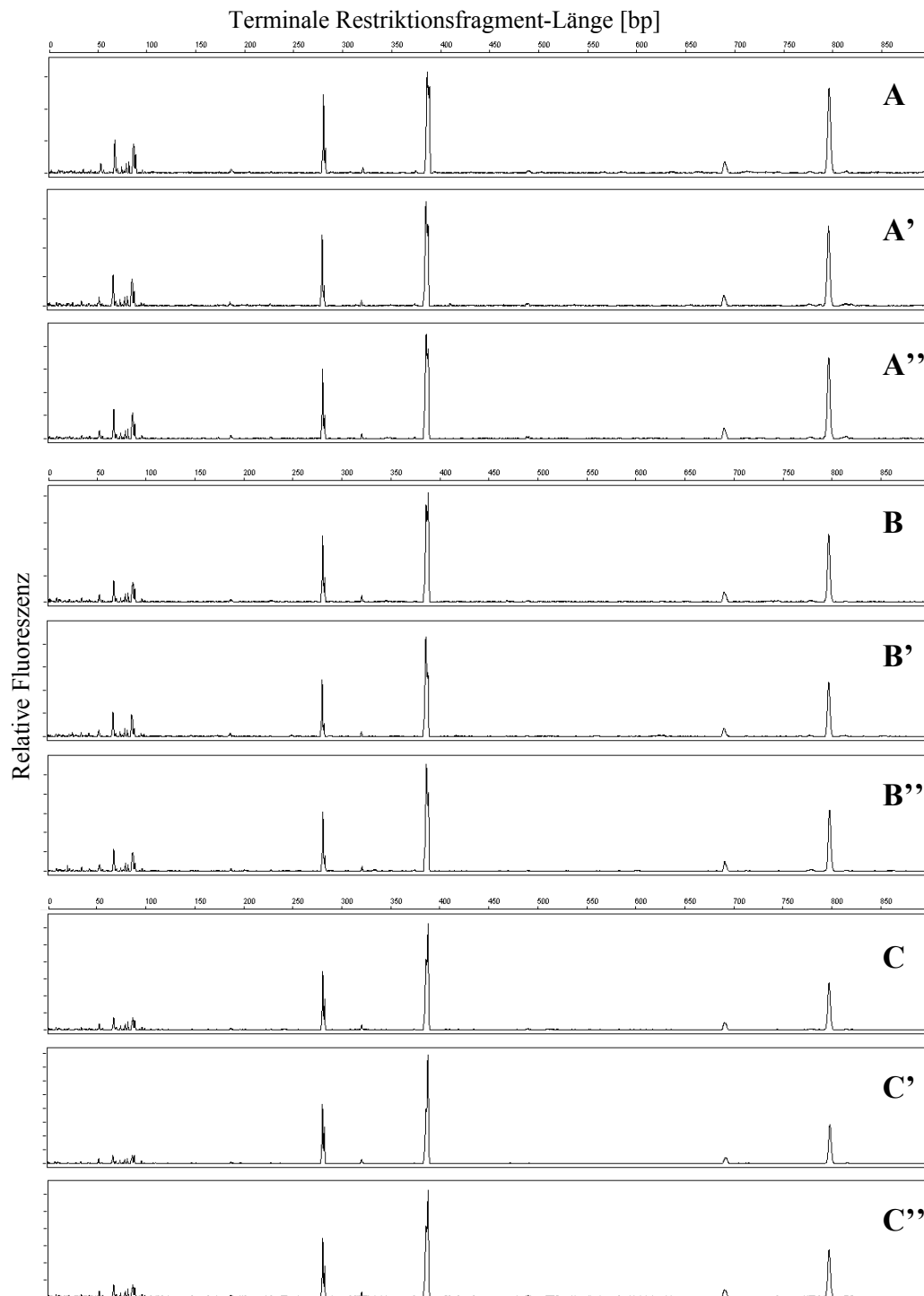


Abbildung 42: Struktur der archaeellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth basierend auf T-RFLP-Analysen archaeeller 16S rRNA-Gene in Sedimentproben vom Januar 2003 (A, A', A''), Juli 2003 (B, B', B'') und Oktober 2003 (C, C', C'') nach Restriktion mit *TaqI*. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

B.2 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.1.3

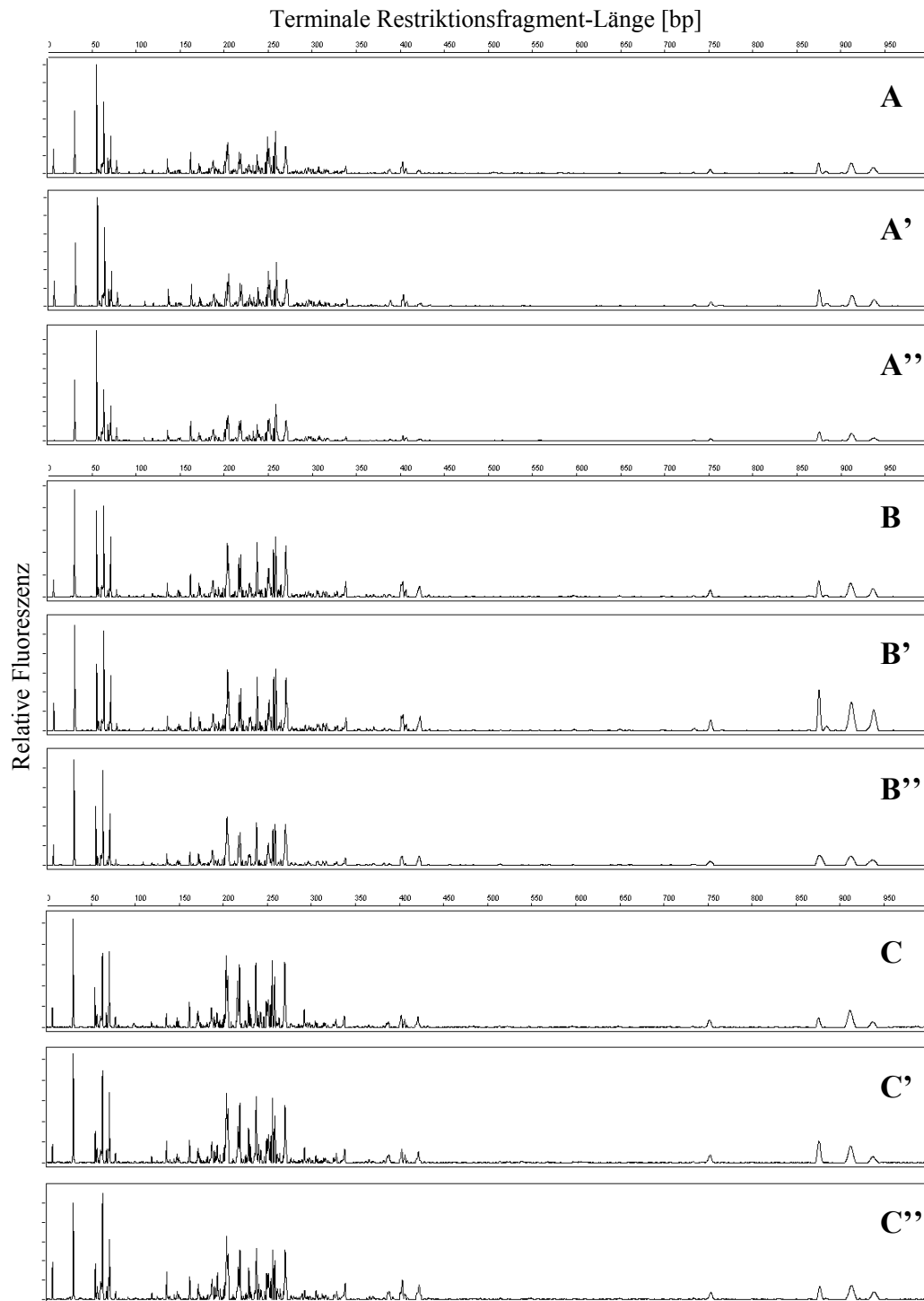


Abbildung 43: Struktur der bakteriellen Gemeinschaft im Profundalsediment des See Genezareth basierend auf T-RFLP-Analysen bakterieller 16S rRNA-Gene in Sedimentproben vom Januar 2003 (A, A', A''), Juli 2003 (B, B', B'') und Oktober 2003 (C, C', C'') nach Restriktion mit *Hae*III. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

B.3 T-RFLP-Profile (Elektropherogramme) zu III.3.2.2

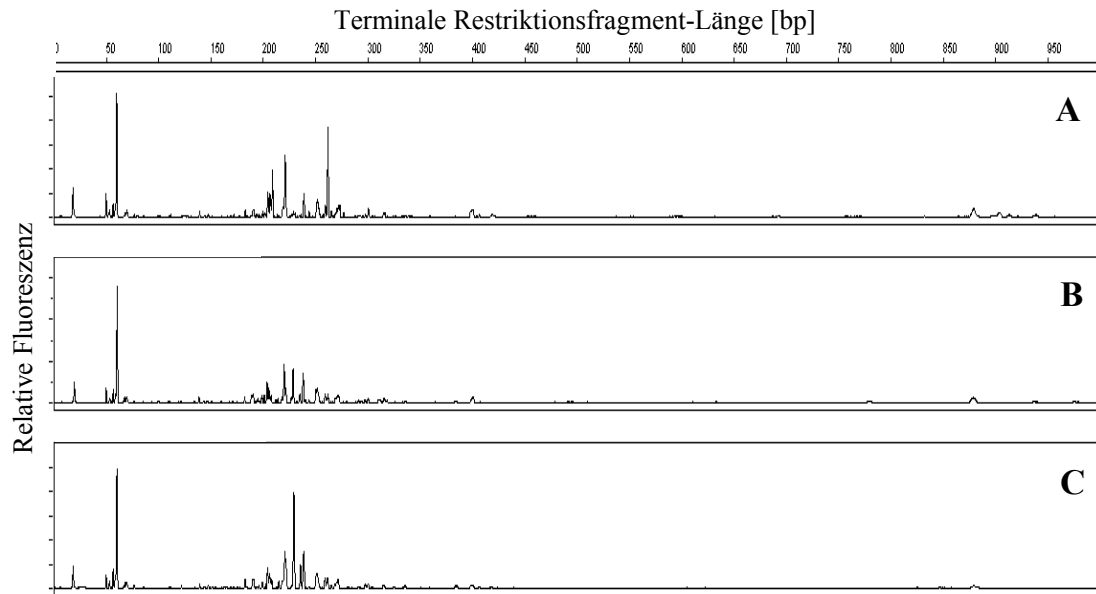


Abbildung 44: Struktur der aktiven bakteriellen Gemeinschaft vor der Dichtegradientenzentrifugation in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach null (A), zehn (B) und 18 (C) Tagen Inkubation bei 30°C mit [U-¹³C]-Acetat basierend auf T-RFLP-Analysen revers-transkribierter bakterieller 16S rRNA nach Restriktion mit *Hae*III. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

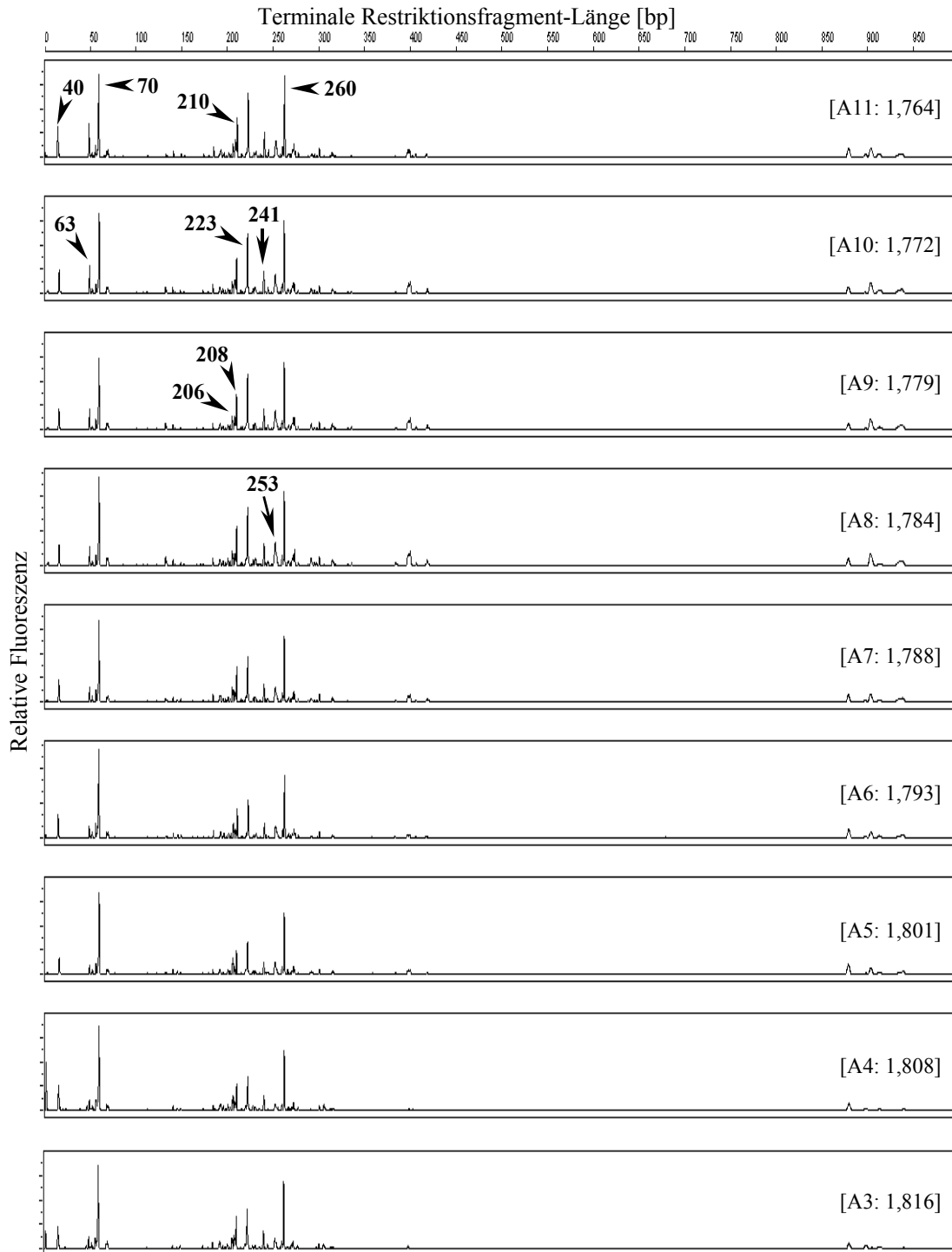


Abbildung 45: T-RFLP-Profile der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten bakteriellen Gemeinschaft von „leichten“ und „schweren“ rRNA Gradientenfraktionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach null Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

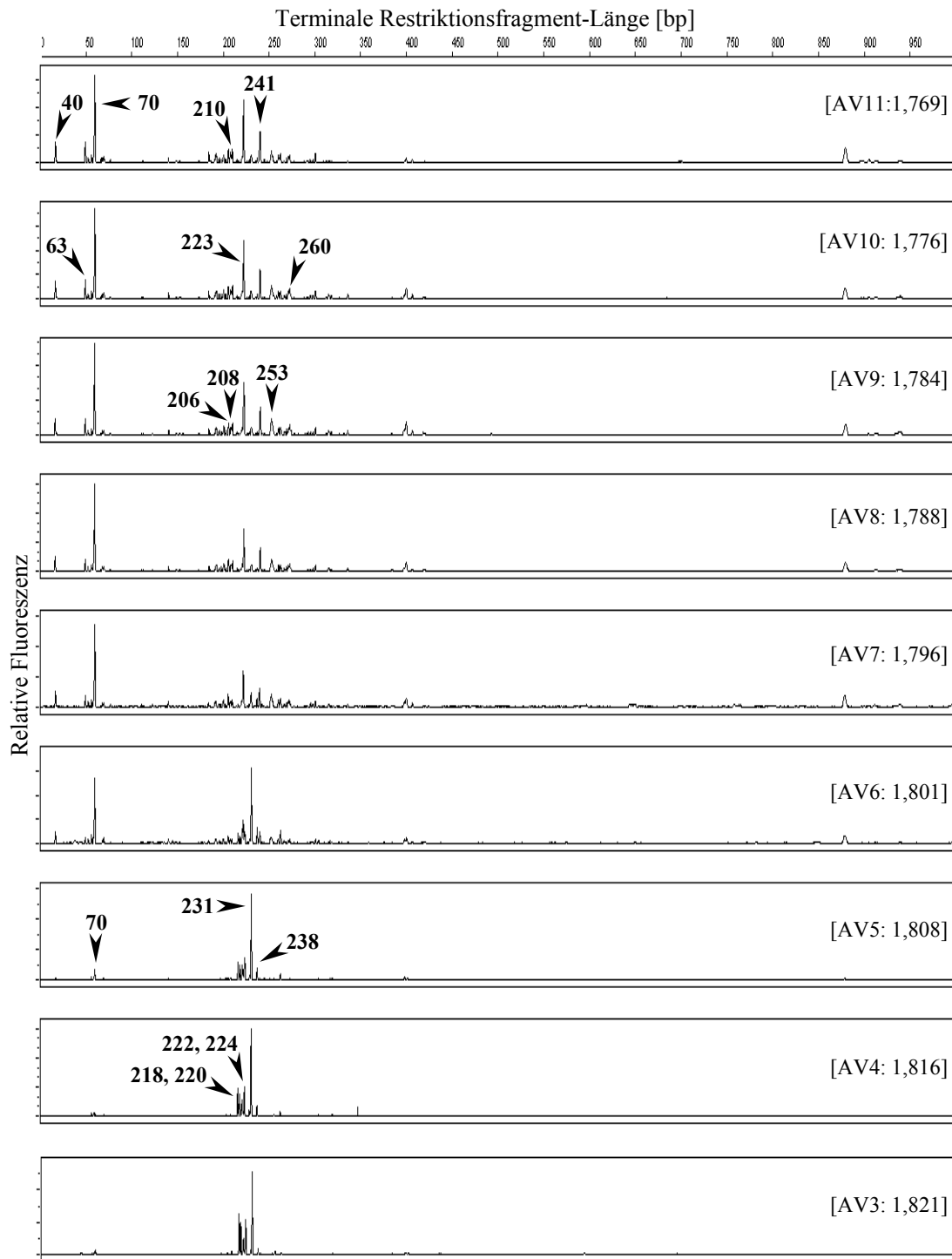


Abbildung 46: T-RFLP-Profile der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten bakteriellen Gemeinschaft von „leichten“ und „schweren“ rRNA Gradientenfractionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach zehn Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fractionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

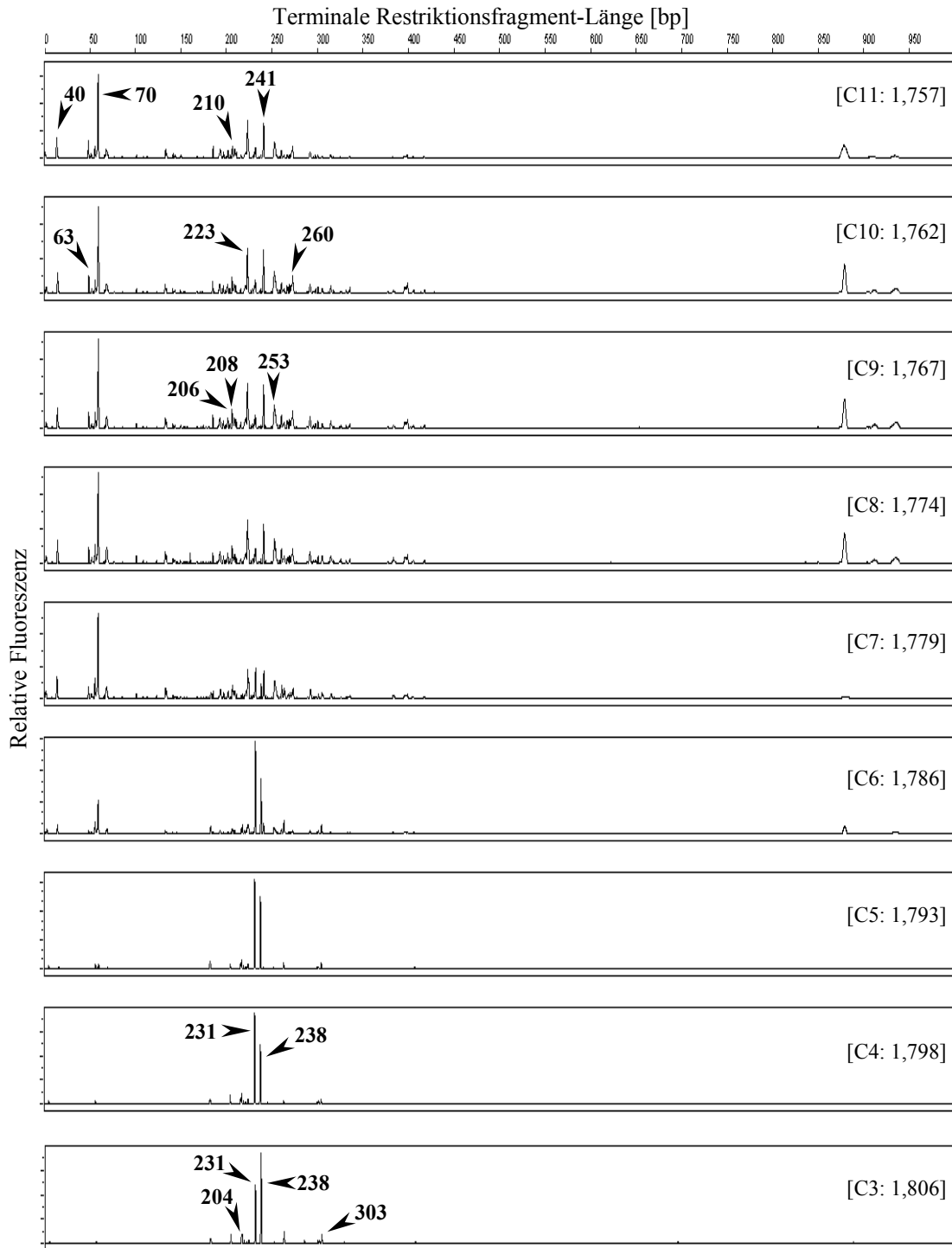


Abbildung 47: T-RFLP-Profile der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten bakteriellen Gemeinschaft von „leichten“ und „schweren“ rRNA Gradientenfractionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach 18 Tagen Inkubation mit [U-¹³C]-Acetat. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fractionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

B.4 T-RFLP-Profil (Elektropherogramme) zu III.4.2.1

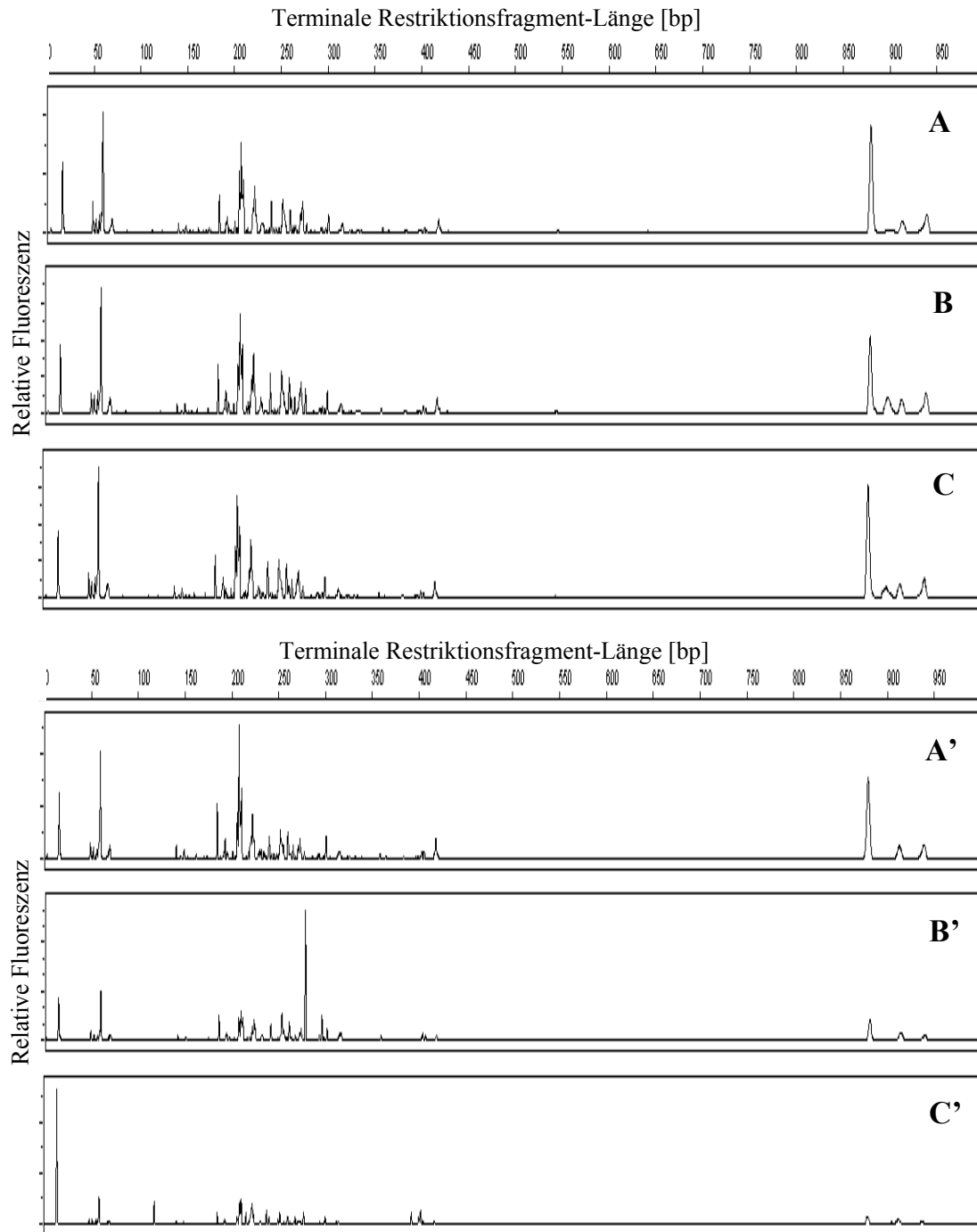


Abbildung 48: Struktur der aktiven bakteriellen Gemeinschaft in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) ohne Zugabe von *P. gatunense*-Zellen zum Zeitpunkt Null (A), nach einem Tag (B) und nach sechs Tagen (C) sowie nach Zugabe von *P. gatunense*-Zellen zum Zeitpunkt Null (A'), nach einem Tag (B') und nach sechs Tagen (C') Inkubation bei 15°C basierend auf T-RFLP-Analysen revers-transkribierter bakterieller 16S rRNA nach Restriktion mit *Hae*III. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben. Abbildung zeigt jeweils eine der drei analysierten Parallelinkubationen.

B.5 T-RFLP-Profil (Elektropherogramme) zu III.4.2.3

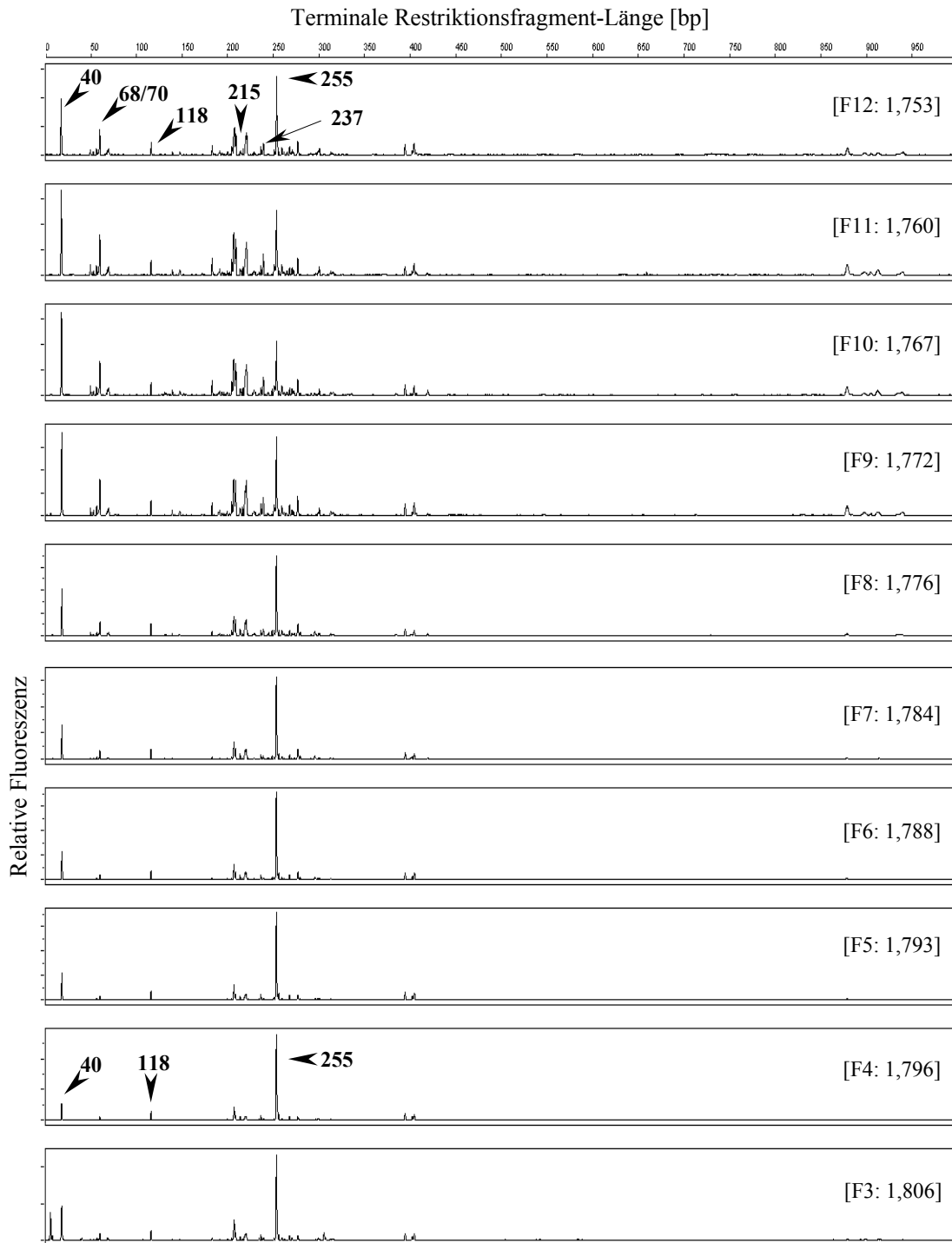


Abbildung 49: T-RFLP-Profil der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten revers-transkribierten bakteriellen 16S rRNA aus „leichten“ und „schweren“ Gradientenfraktionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach sechs Tagen Inkubation mit $[^{13}\text{C}]$ -markierten *P. gatumense*-Zellen. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

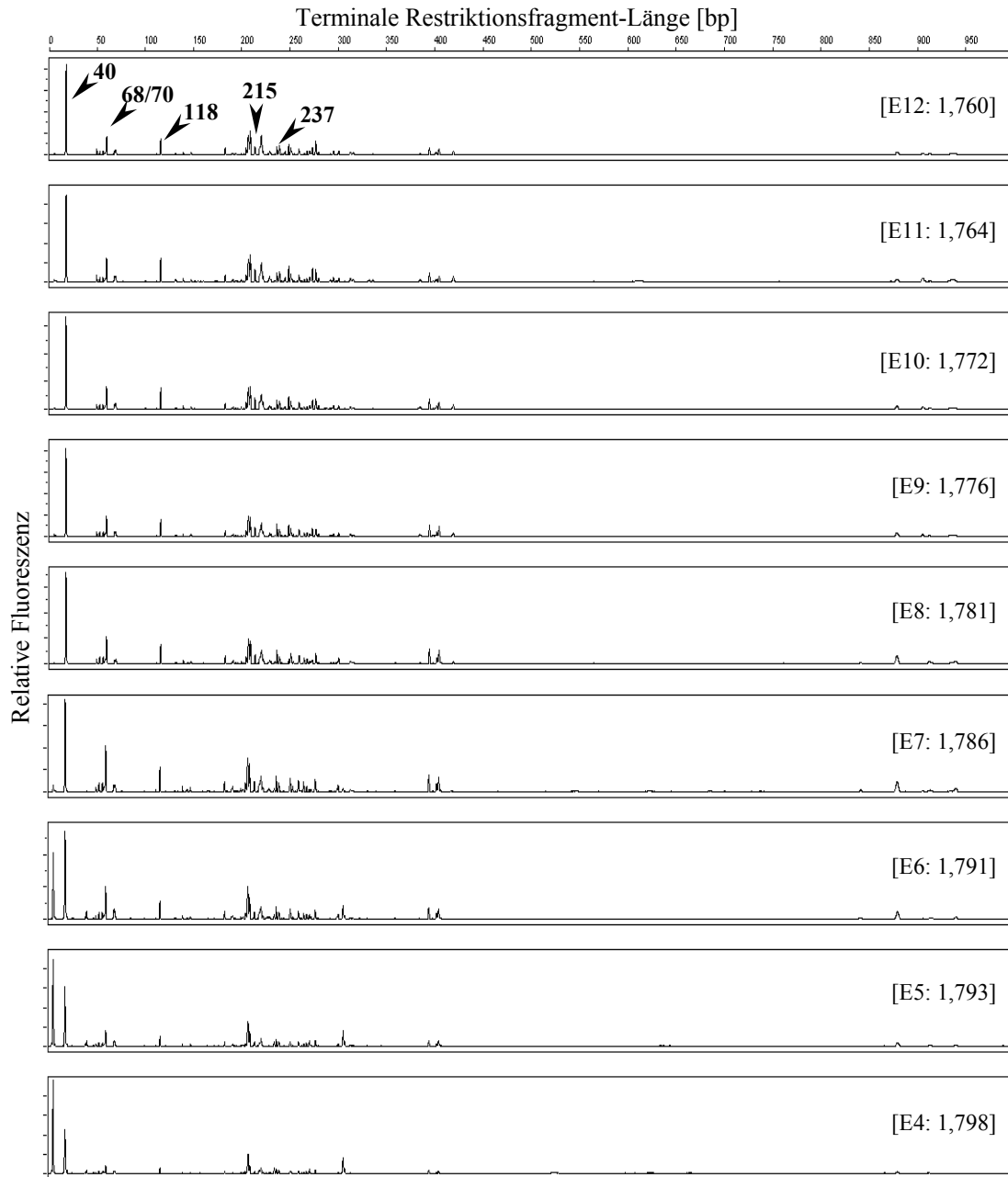


Abbildung 50: T-RFLP-Profile der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennten revers-transkribierten bakteriellen 16S rRNA aus „leichten“ und „schweren“ Gradientenfraktionen des RNA-Extrakts aus einer Sedimentaufschlammung des Profundalsediments (0-10 cm Tiefe) nach sechs Tagen Inkubation mit (nicht-markierten) *P. gatunense*-Zellen. CsTFA-Dichte und Bezeichnung der einzelnen Fraktionen sind in Klammern “[]” angegeben. Die Fragmentlängen der T-RFs sind in Basenpaaren [bp] angegeben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Julia Ingeborg Klara Schwarz
geb. am 23.03.1978
in Mannheim-Neckarau

Dissertation

seit 01.2003

Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie in Marburg
unter Anleitung von Prof. Dr. R. Conrad
„Identifizierung aktiver mikrobieller Populationen mit Hilfe
stabiler Isotope“

Studium

Diplomstudiengang Biologie
an der Philipps-Universität Marburg

WS 2001/2002 – SS 2002

Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie in Marburg
unter Anleitung von Prof. Dr. R. Conrad
„Einfluss der Temperatur auf die Nitrat-reduzierende
Lebensgemeinschaft im Boden“

09.2002

Abschluss: Diplom-Biologin

WS 1999/2000 – SS 2001

Hauptstudium mit Fächerkombination:
Mikrobiologie, Genetik, Virologie und Biochemie

WS 1997/98 – SS 1999

Grundstudium

Weiterbildungen

12.2004

Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit, München

Berufliche Tätigkeit

04. – 05.2001

Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie,
Marburg

02. – 03.2001

Industriepraktikum, Thor Chemie GmbH, Speyer

04. – 06.2000

Wissenschaftliche Hilfskraft, Fachbereich Mikrobiologie,
Philipps-Universität Marburg

Schulbildung

1984 – 1988

Friedrich-von-Schiller-Schule, Reilingen

1988 – 1997

Hans-Purmann-Gymnasium, Speyer
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Besondere Kenntnisse**Methodenspektrum**

Mikrobiologische Techniken (Mikroskopie, aerobe und anaerobe Steril- und Kulturtechniken)
Molekularbiologische Techniken (PCR, RT-PCR, quantitative PCR, FISH, genetische Fingerabdruckmethoden, Klonierung, Sequenzierung)
Mess- und Analysetechniken (GC, HPLC, kolorimetrische Messungen)
Verwendung von stabilen Isotopen und von Radioisotopen

Fremdsprachen

Englisch, in Wort und Schrift
Französisch, Grundkenntnisse

Führerschein

Klasse 3

Publikationen

„Community structure of *Archaea* and *Bacteria* in a profundal lake sediment, Lake Kinneret (Israel)”

J. I. K. Schwarz, W. Eckert und R. Conrad
angenommen bei Systematic and Applied Microbiology

„Identification of acetate-utilizing *Bacteria* and *Archaea* in a profundal lake sediment, Lake Kinneret (Israel), by stable-isotope probing of rRNA”

J. I. K. Schwarz, T. Lueders, W. Eckert und R. Conrad
angenommen bei Environmental Microbiology

Kongressbeiträge und Workshops

Jahrestagung der VAAM (2006), Jena

„Response of the microbial community of a profundal Lake sediment (Lake Kinneret) to algal deposition under anaerobic conditions“ (Poster)

J. I. K. Schwarz, W. Eckert und R. Conrad

Same 9 (2005), Helsinki

„Identification of the acetate-utilizing microbial community in Lake Kinneret profundal sediment by stable-isotope probing” (Vortrag)

German Israeli Minerva School at The Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory (2004), Israel

„Identification and quantification of metalimnetic processes in a subtropical lake: Lake Kinneret as a case study“ (Workshop)

Jahrestagung der VAAM (2004), Braunschweig

„Microbial diversity in Lake Kinneret Sediment“ (Poster)

J. I. K. Schwarz und R. Conrad

Internationales Symposium, „Structure and Function of Soil Microbiota“ (2004), Marburg

„Temperature effects on denitrifying populations in an agricultural soil” (Poster)

J. I. K. Schwarz und G. Braker

Marburg, 13.07.2006

Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad und Herrn Prof. Rudolf K. Thauer für die Erstellung der Gutachten dieser Arbeit und bei Frau Prof. Dr. Birgit Ziegenhagen und Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für die Beteiligung an der Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt Dr. Werner Eckert, der mich immer wieder mit Sedimentproben versorgte und ohne dessen „Kurierdienste“ diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory bedanken, die mich während meines Aufenthalts in Israel herzlichst aufgenommen haben.

Dr. Tillmann Lüders möchte ich für die Einführung in die Stable-Isotope-Probing-Technik danken. Bei Melanie Klose, Katja Meuser und Bianca Pommerenke bedanke ich mich für die Einführung in molekularbiologische und biogeochemische Methoden sowie für den Beistand und die Lösung vielerlei technischer Probleme. Peter Claus danke ich für die Durchführung der GC-C-IRMS- und HPLC-IRMS-Analysen und Markus Drescher für die Beseitigungen jeglicher Art von Computerproblemen.

Steffen Kolb, Andrea Graff, Daniel Scheid, Matthias Noll, Christina Bremer und Holger Penning danke ich für geistreiche Diskussionen, viele schöne Stunden im Labor, gelegentliche Zerstreuung, aber auch für so manche moralische Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Gesche Braker, Dana Kemnitz und Andrea Graff vor allem in der letzten Phase der Arbeit. Ferner danke ich der gesamten Abteilung Biogeochemie für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich Daniel, der trotz der großen Entfernung die Höhen und Tiefen der letzten Jahre miterlebt hat und mir immer zur Seite steht.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir dieses Studium und vieles mehr ermöglicht haben. Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Schwester möchte ich außerdem von Herzen danken, dass sie immer für mich da sind.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Identifizierung aktiver mikrobieller
Populationen mit Hilfe stabiler Isotope“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 13.07.2006